Aus der Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik von
Hormon- und Stoffwechselstörungen
Direktor: Professor Dr. D. Gupta
der Kinderklinik der Universität Tübingen

QUANTITATIVE BESTIMMUNG DES SEXUALHORMON-BINDENDEN GLOBULINS (SHBG) IM SERUM VON MÄDCHEN IN DER PUBERTÄT, VON KINDERN MIT ENDOKRINOPATHIEN UND VON MÄNNERN MIT PROSTATAERKRANKUNGEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Hans-Gerhard Scheel-Walter
aus Stolzenau

1979

Aus der Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik von
Hormon- und Stoffwechselstörungen
Direktor: Professor Dr. D. Gupta
der Kinderklinik der Universität Tübingen

QUANTITATIVE BESTIMMUNG DES SEXUALHORMON-BINDENDEN GLOBULINS (SHBG) IM SERUM VON MÄDCHEN IN DER PUBERTÄT, VON KINDERN MIT ENDOKRINOPATHIEN UND VON MÄNNERN MIT PROSTATAERKRANKUNGEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Hans-Gerhard Scheel-Walter
aus Stolzenau

1979

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1	E I N L E I T U N G	1
1.1	ENTDECKUNG UND BIOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN DES SEXUALHORMON-BINDENDEN PROTEIN	1
1.2	DIE ROLLE DES SHBG IM MENSCHLICHEN PLASMA	3
1.3	ZIEL UND FRAGESTELLUNG	8
2	U N T E R S U C H T E P E R S O N E N	10
2.1	MÄDCHEN IN DER PUBERTÄT UND FRAUEN IM GESCHLECHTSREIFEN ALTER	10
2.2	KINDER MIT VERSCHIEDENEN ENDOKRINOLOGISCHEN ERKRANKUNGEN	12
2.3	MÄNNER MIT PROSTATA-ERKRANKUNGEN	13
3	M A T E R I A L	14
3.1	SERUMPROBEN	14
3.2	CHEMIKALIEN	14
3.3	GERÄTE	16
4	M E T H O D E	17
4.1	VORBEMERKUNGEN	17
4.2	PRINZIP	17
4.3	DURCHFÜHRUNG	19
4.4	BERECHNUNG	22
4.5	STATISTISCHE METHODEN	24
4.6	BEURTEILUNG DES TRF-TESTES	25
5	E R G E B N I S S E	27
5.1	ÜBERPRÜFUNG DER METHODE	27
5.2	SHBG-BESTIMMUNG BEI MÄDCHEN WÄHREND DER PUBERTÄT	28
5.3	SHBG-BESTIMMUNG BEI KINDERN MIT VERSCHIEDENEN ENDOKRINOPATHIEN	35
5.3.1	Kinder mit Schilddrüsenerkrankungen	35
5.3.2	Kinder mit weiteren Endokrinopathien	38
5.4	SHBG-BESTIMMUNG BEI MÄNNERN MIT PROSTATA-ERKRANKUNGEN	40

		Seite
6	D I S K U S S I O N	42
6.1	DISKUSSION DER METHODE	42
6.2	SHBG BEI MÄDCHEN IN DER PUBERTÄT	44
6.3	SHBG BEI KINDERN MIT ENDOKRINOPATHIEN	50
6.4	SHBG BEI MÄNNERN MIT PROSTATA-ERKRANKUNGEN	53
7	Z U S A M M E N F A S S U N G	55
8	L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	57

1 EINLEITUNG

1.1 ENTDECKUNG UND BIOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN DES SEXUALHORMON-BINDENDEN PROTEIN

Wie für andere Hormone auch, existiert für die Sexualhormone ein spezielles Bindungsprotein im menschlichen Plasma. Die Erforschung von Sexualhormon-bindenden Proteinen beim Menschen beginnt Anfang der fünfziger Jahre. Zunächst ist die Bindung von Testosteron an Plasmaalbumine untersucht worden, so von EIK-NES et al (1954), WESTPHAL et al (1962) und ALFSEN (1963). Mitte der sechziger Jahre gelingt es MERCIER et al (1966), ein Testosteron-bindendes Plasmaprotein nachzuweisen, das von den Albuminen und vom Corticosteroid-bindenden Globulin abtrennbar ist. Etwa gleichzeitig kann ROSENBAUM mit Mitarbeitern (1966) ein Östradiol-bindendes Globulin nachweisen. In der Folgezeit entdeckt man, daß Östradiol-bindendes und Testosteron-bindendes Protein identisch sind, d.h. daß beide Hormone an derselben Bindungsstelle eines Plasmaglobulins gebunden werden (MURPHY 1968). Von dieser Entwicklung her ist es verständlich, daß in der Literatur eine Reihe von verschiedenen Bezeichnungen für dieses Protein auftauchen: Testosteron-bindendes Globulin (TeBG), Testosteron-Östradiol-bindendes Globulin, Sexual steroid binding protein (SSBP) und Sexualhormon-bindendes Globulin (SHBG), wie es im weiteren genannt wird.

Die wichtigsten biochemischen Eigenschaften des SHBG sind: SHBG stellt sich elektrophoretisch als beta-Globulin dar (MERCIER 1966). Dieses Ergebnis bestätigen auch RAGER und GUPTA (1972), die SHBG mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) isoliert haben. Das Molekulargewicht des SHBG wird von MERCIER-BODARD et al (1970) auf 52000 und von einigen anderen Forschern auf Werte zwischen 95000 und 115000 geschätzt (VAN BAELEN et al 1968, ROSNER et al 1969, CORVOL et al 1971, HANSSON et al 1972). BLANK (1975), der die unten beschriebene Bestimmungsmethode für SHBG entwickelt hat, geht von einem Molekulargewicht von 115000 (erhalten durch Gelfiltration) aus. SHBG hat eine relativ geringe Bindungskapazität für die Steroide, die gebunden werden; dagegen ist die Bindungsaffinität zu den betreffenden Steroiden sehr hoch: die Assoziationskonstante für die Bindung von Testosteron ($K_{25°C}$) zum Beispiel beträgt $4 - 16 \times 10^8$ l/Mol gegenüber einer $K_{25°C}$ von 2.38×10^4 l/Mol für die Bindung von Testosteron an Plasmaalbumine (VERMEULEN und VERDONCK 1968). Die Bindungsaffinität des SHBG zu den verschiedenen gebundenen Steroiden ist unterschiedlich: zu 5-alpha-Dihydrotestosteron (DHT) ist sie etwa dreimal so hoch wie zu Testosteron, zu Östradiol ist sie etwa dreifach niedriger als zu Testosteron (ANDERSON 1974). Pro Molekül SHBG ist nur eine Bindungsstelle für Steroide vorhanden (MERCIER-BODARD et al 1970). Steroide werden nur gebunden, wenn sie

folgende Strukturmerkmale aufweisen: eine 17-beta-Hydroxylgruppe und einen ebenen A-Ring (VERMEULEN et al 1968, ANDERSON 1974). Aus diesem Grund werden Corticosteroide nicht gebunden.

1.2 DIE ROLLE DES SHBG IM MENSCHLICHEN PLASMA

Nachdem ausreichende Methoden zur Bestimmung der Testosteron-Bindungsaffinität (TBA), der Testosteron-Bindungskapazität (TeBC) oder direkt der SHBG-Konzentration im Serum bzw. Plasma bekannt geworden sind, sind eine Reihe von Arbeiten erschienen, die die Rolle des SHBG im Plasma gesunder sowie kranker Personen erforschen.

Wie PEARLMAN (1970) beschreibt, liegen nur zwischen zwei und fünf Prozent des Testosteron im Plasma ungebunden und damit biologisch wirksam vor, was zum großen Teil auf der Bindung an SHBG beruht. Weiterhin zeigt sich, daß die Sexualhormone selbst einen Einfluß auf die Bindungsaktivität des SHBG haben, was wohl hauptsächlich über die Änderung der SHBG-Konzentration im Plasma geregelt wird: so setzen Östrogene die Bindungsaktivität herauf, wohingegen Androgene sie herabsetzen (VERMEULEN et al 1968, DE MOOR 1970 und ANDERSON et al 1972 a). Diese Tatsache regt ANDERSON (1974) dazu an, dem SHBG die Rolle eines "servo-amplifier" für Sexualhormone zuzuschreiben: nimmt das

Plasmatestosteron zu, wird die SHBG-Bindungsaktivität absinken und weniger Testosteron gebunden; damit steigt das ungebundene, wirksame Testosteron stärker an als es dem ursprünglichen Anstieg entspricht; steigt dagegen der Östrogenspiegel des Plasmas, nimmt auch die SHBG-Aktivität zu und es wird vermehrt Testosteron gebunden; dadurch ist das Gleichgewicht zwischen Androgen und Östrogen im Plasma mehr zugunsten des Östrogens verschoben als es dem Anstieg des Östrogens entspricht.

Quantitative Bestimmungen der Testosteron-Bindungsaffinität (TBA), der Testosteron-Bindungskapazität (TeBC) oder der prozentualen Testosteronbindung im Plasma bei verschiedenen Gruppen von Personen ergeben folgendes Bild:
Kinder vor der Pubertät haben eine höhere TBA als Erwachsene, Frauen eine höhere als Männer (AUGUST et al 1969). Während in dieser Arbeit bei Mädchen eine geringfügig höhere TBA gefunden wird als bei Jungen, finden VERMEULEN und Mitarbeiter (1969) keine Geschlechtsunterschiede in der Höhe der TeBC vor der Pubertät. Einen leichten Anstieg der prozentualen Testosteronbindung des Plasmas finden GUPTA und Mitarbeiter (1971 b, 1974, 1975 c) bei Mädchen während der Pubertät, während sie bei Jungen einen Abfall im Verlauf der Pubertät feststellen. Bei schwangeren Frauen steigt die TeBC auf Werte an, die fünf- bis zehnmal höher liegen als vor der Schwangerschaft; auch unter der Einnahme östrogen-

haltiger Medikamente (z.B. orale Kontrazeptiva) kommt es zu ähnlich hohen Werten (VERMEULEN et al 1968, CORVOL et al 1971). Die TeBC von Frauen mit Hirsuitismus liegt zwischen der von normalen Frauen und der von normalen Männern (ROSENFIELD 1971). Bei Männern nimmt die TeBC mit zunehmendem Alter zu: 20-50 jährige haben mit durchschnittlich 5,2 x 10^{-8} Mol/l eine niedrigere Bindungskapazität als die 70-90 jährigen mit durchschnittlich 8,2 x 10^{-8} Mol/l (VERMEULEN et al 1972). Dieselbe Forschergruppe stellt auch bei Männern mit Hypogonadismus eine erhöhte TeBC - vergleichbar der von erwachsenen Frauen - fest (VERMEULEN et al 1969). Ebenso haben Knaben mit Hodenhochstand eine erhöhte Testosteronbindung entsprechend ihrem niedrigen "Androgen-Status"; dieser "Androgen-Status" steigt auf ein höheres Niveau unter der Therapie mit Gonadotropin (HCG-Therapie); entsprechend sinkt die prozentuale Testosteronbindung im Plasma (GUPTA et al 1972 b, ATTANASIO et al 1973). Bei Männern mit chronischer Niereninsuffizienz ist die prozentuale Testosteronbindung im Plasma signifikant höher als bei gesunden Männern gleichen Alters (GUPTA und BUNDSCHU 1972 a). Schilddrüsenhormon hat offenbar einen Einfluß auf die SHBG-Bindungsaktivität oder die SHBG-Produktion, denn Patienten mit Hyperthyreose weisen eine hohe Testosteronbindung auf, die unter der Behandlung mit Thyreostatika auf Normalwerte sinkt; dagegen liegt die Testosteronbindung bei Hypothyreose relativ niedrig

und steigt unter Substitutionsbehandlung (OLIVO et al 1970).

Die bisher aufgeführten Arbeiten basieren auf recht unterschiedlichen Methoden. Die TBA oder TeBC ist zwar ein ungefähres Maß auch für die SHBG-Konzentration im Plasma, da SHBG zum großen Teil die Bindung des Testosteron bedingt, aber quantitativ vergleichbare Meßgrößen sind bei diesen Methoden nicht zu erwarten. Erst die unten angeführten neueren Arbeiten benutzen zum Nachweis des SHBG markiertes 5-alpha-Dihydrotestosteron (DHT). Da DHT von allen Steroidhormonen die größte Affinität zu SHBG hat und auch nicht - wie Testosteron - an das Corticosteroid-bindende Globulin (CBG) gebunden wird, führen diese Nachweismethoden eher zu vergleichbaren Meßergebnissen (ANDERSON 1974).
DE MOOR und Mitarbeiter (1972) zeigen, daß auch Wachstumshormon einen Einfluß auf die SHBG-Aktivität hat: von ihm geht ein akuter und ein chronischer Effekt aus, was sich jeweils in einer Erniedrigung der SHBG-Aktivität auswirkt. Patienten mit Akromegalie haben dementsprechend erniedrigte SHBG-Konzentrationen. Bei Männern mit chronischen Lebererkrankungen liegt die SHBG-Konzentration etwa doppelt so hoch wie bei gesunden Männern, während die 17-beta-Hydroxyandrogene im Serum niedriger liegen und das Plasmaöstradiol bei normal hohen Werten bleibt; dies stellen GALVAO-TELES und Mitarbeiter (1973) bei der Simultanbestimmung von ungebundenen 17-beta-

Hydroxyandrogenen, ungebundenem Östradiol, LH und SHBG im Plasma bzw. Serum fest. TULCHINSKI und CHOPRA (1973) hingegen finden keinen signifikanten Unterschied zwischen den SHBG-Konzentrationen von Männern mit Leberzirrhose und von gesunden Männern; sie bestätigen mit ihrer Meßmethode die oben erwähnten Ergebnisse von OLIVO et al (1970) bei Patienten mit Hyper- und Hypothyreose; bei Neugeborenen sind die SHBG-Konzentrationen nicht geschlechtsabhängig und ähnlich hoch wie bei erwachsenen Frauen; der hohe SHBG-Spiegel von Frauen am Ende der Schwangerschaft fällt innerhalb von sechs Wochen auf ein Fünftel seines Wertes ab und erreicht so den Wert des SHBG-Spiegels von nichtschwangeren Frauen. Messungen der SHBG-Konzentrationen an verschiedenen Tagen des Menstruationszyklus bei ein und derselben Frau ergeben keine signifikanten Änderungen des SHBG-Spiegels in Abhängigkeit von der Zeit nach der letzten Regelblutung (ANDERSON 1974). Bei Schwangerschaft besteht zwischen mütterlichem und fetalem SHBG ein sehr hoher Konzentrationsgradient, sodaß bei der Mutter durchschnittlich eine 21-fach höhere SHBG-Konzentration gefunden wird als beim Feten (ANDERSON et al 1976).

Mit der von BLANK (1975) entwickelten und unten beschriebenen Methode haben ATTANASIO und Mitarbeiter (1975) das Serum-SHBG bei Knaben mit Kryptorchismis bestimmt und stellen fest, daß diese - verglichen mit Knaben gleichen Alters - eine höhere SHBG-Konzentration haben.

1.3 ZIEL UND FRAGESTELLUNG

In einer Reihe von Arbeiten wird die Veränderung der Plasmakonzentration verschiedener Sexualhormone und der Ausscheidung ihrer Stoffwechselprodukte über den Urin in Abhängigkeit vom Pubertätsstadium nach TANNER bestimmt; dabei handelt es sich sowohl um Längsschnitt- als auch um Querschnittuntersuchungen (GUPTA 1970, 1974, 1975 a, GUPTA et al 1971 a, 1972 b, c, 1975 b, c, RAAF 1974). Nachdem eine einfache Methode zur quantitativen Bestimmung des SHBG im Serum entwickelt und zur Messung des Serum-SHBG bei Jungen in den einzelnen Pubertätsstadien angewandt worden ist (BLANK et al 1978), stellt sich die Frage, wie sich die SHBG-Konzentration bei Mädchen im Verlauf der Pubertät verändert. Bisher weisen ähnliche Untersuchungen - wie oben aufgezeigt - sich einander widersprechende Ergebnisse vor.

Während viele Untersuchungen zur Rolle des SHBG bei endokrinologischen Erkrankungen im Erwachsenenalter vorliegen, fehlen solche Untersuchungen bei Kindern. Deswegen soll bei einigen Kindern mit Endokrinopathien das SHBG im Serum bestimmt werden.

Ergänzend zu schon erschienenen Arbeiten (z.B. BARTSCH et al 1977) wird SHBG im Serum von Männern mit Erkrankungen der Prostata bestimmt.

So ist es das Ziel der vorliegenden Arbeit :

1. die unten beschriebene Methode zur quantitativen Bestimmung des SHBG im menschlichen Serum auf ihre praktische Anwendbarkeit zu prüfen ,

2. das Verhalten der SHBG-Konzentration im Serum bei Mädchen während der sexuellen Reifung zu untersuchen und die durchschnittliche Höhe der SHBG-Konzentration in den einzelnen Pubertätsstadien im Vergleich zu der von erwachsenen Frauen zu bestimmen ,

3. die SHBG-Konzentration in einzelnen Fällen von endokrinologischen Erkrankungen bei Kindern zu ermitteln und mit der gesunder Kinder zu vergleichen ,

4. das SHBG im Serum von Männern mit Prostata-Erkrankungen zu bestimmen und mit dem von gesunden Männern gleichen Alters zu vergleichen .

2 UNTERSUCHTE PERSONEN

2.1 MÄDCHEN IN DER PUBERTÄT UND FRAUEN IM GESCHLECHTSREIFEN ALTER

Es wird bei 41 Mädchen im Alter zwischen 6 und 16 Jahren die SHBG-Konzentration im Serum bestimmt. Hinzu kommen 26 erwachsene Frauen als Vergleichsgruppe im Alter zwischen 17 und 45 Jahren.

Der größte Teil der Mädchen (37) war zum Zeitpunkt der Blutentnahme stationär in der Kinderklinik der Universität Tübingen aufgenommen. Es lagen bei ihnen keine endokrinologischen Erkrankungen vor und es bestand keine Therapie, die - nach den bisherigen Erkenntnissen - den SHBG-Spiegel im Serum beeinflußt hätte. Vier der Mädchen und alle 26 Frauen waren Patienten der Ambulanz des Paul-Lechler-Krankenhauses in Tübingen. Sie waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme gesund und nahmen keine hormonhaltigen Medikamente (Kontrazeptiva u.ä.) ein. Eine Schwangerschaft bestand in keinem Fall.

Da das chronologische Alter kein Kriterium für den Entwicklungsstand eines Kindes ist, wird bei den Mädchen anhand der Kriterien von TANNER (1962) das Pubertätsstadium festgelegt. So werden die Mädchen in fünf Gruppen aufgeteilt, entsprechend den von TANNER angegebenen fünf Stadien für Schamhaar- und Brustentwicklung. Diese Stadieneinteilung ist im folgenden wiedergegeben:

Stadium 1 Vorpubertät
P: Die Pubes sind nicht stärker entwickelt als die Behaarung über der Bauchhaut, eigentliches Schamhaar ist also nicht vorhanden.
B: Ausschließliches Hervortreten der Papille.

Stadium 2 P: Spärliches Wachstum langer, leicht pigmentierter, daunenfederartiger Haare, die glatt oder leicht gelockt sind und hauptsächlich im Bereich der Labien erscheinen.
B: Knospenbrust: Hervortreten der Brust und der Papille als kleine halbkugelige Erhebung. Vergrößerung des Warzenhof-Durchmessers.

Stadium 3 P: Behaarung beträchtlich dunkler, gröber und stärker gelockt; das Haarfeld breitet sich spärlich über das Schamdreieck aus.
B: Weitere Vergrößerung und Vorwölbung der Brust und des Warzenhofes ohne Trennung ihrer Konturen.

Stadium 4 P: Die Behaarung ähnelt jetzt dem Erwachsenentyp, das Haarfeld ist aber noch erheblich kleiner. Keine Ausbreitung auf die Medialfläche des Oberschenkels.
B: Gesonderte Vorwölbung des Warzenhofes und der Papille als eine zweite halbkugelige Erhebung über der eigentlichen Oberfläche der Brust.

Stadium 5 P: Schambehaarung wie bei Erwachsenen. Horizontale obere Begrenzung (klassischer femininer Behaarungstyp) und Ausdehnung der Behaarung auf die mediale Oberfläche der Oberschenkel.
B: Stadium der Reife: Zurückweichen des Warzenhofes in die allgemeine Kontur der Brust. Nur die Papille tritt noch besonders hervor.

(P = Pubes, B = Brust)

Zu dieser Stadieneinteilung muß angemerkt werden, daß im Einzelfall das Stadium für Brust- und Schamhaar-

entwicklung nicht immer zeitlich übereinstimmt. So fehlt das Stadium B 4 bei 25 % aller Mädchen (TANNER 1962). Eine Einteilung nach P-Stadien gibt es in entsprechender Form auch für Knaben. Da mit der Einteilung nach der Schamhaarentwicklung ein Vergleich zwischen Knaben und Mädchen direkt möglich ist, wird bei dieser Arbeit im Falle einer Nicht-Übereinstimmung von P- und B-Stadium die Einteilung nach dem P-Stadium unternommen. Angegeben wird in jedem Fall nur das P-Stadium (siehe Kapitel "Ergebnisse").

Bei vier der oben genannten Mädchen konnte eine Inspektion nicht vorgenommen werden. Jedoch lag bei ihnen die Menarche zwischen 3 und 12 Monaten zurück, sodaß angenommen werden durfte, daß sie sich im Stadium P 5 befanden (nach TANNER 1962).

2.2 KINDER MIT VERSCHIEDENEN ENDOKRINOLOGISCHEN ERKRANKUNGEN

Die Seren von 17 Mädchen zwischen 2 und 14 Jahren und von 9 Knaben zwischen 3 und 14 Jahren werden auf ihren Gehalt an SHBG untersucht.

Bei diesen 26 Kindern, die alle Patienten der Universitäts-Kinderklinik Tübingen und der zugehörigen Poliklinik waren, wurden dort endokrinologische Erkrankungen diagnostiziert und zum Teil medikamentös behandelt. Bei 15 dieser Kinder wurde gleichzeitig zur SHBG-Bestimmung

ein TRF-Test (siehe Kapitel "Methode") durchgeführt.

2.3 MÄNNER MIT PROSTATA-ERKRANKUNGEN

Für diesen Teil der Arbeit werden die Seren von 87 Männern im Alter über 50 Jahren auf ihren Gehalt an SHBG untersucht. Die Männer sind in vier Gruppen eingeteilt, wobei 26 Männer mit Prostata-Adenomen (im Sinne von Prostata-Hyperplasie) die Gruppe I, 42 Männer mit virginellen Prostata-Karzinomen die Gruppen II und III und 19 Männer die (gesunde) Kontrollgruppe IV bilden.

Alle Männer waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme Patienten der Abteilung für Urologie am Universitäts-Klinikum in Mainz. Die Seren kamen in tiefgefrorenem Zustand zur Untersuchung und wurden bis zur Bestimmung bei -18 ^{o}C gehalten.

3 M A T E R I A L

3.1 SERUM-PROBEN

Zur Bestimmung des SHBG im Serum wird venöses Blut abgenommen und bis zum Eintreten der Gerinnung stehengelassen. Dann wird das Blut mit dem Glasstab umgerührt und 5 Minuten bei ca. 3000 U/min zentrifugiert. Das überstehende Serum wird in Mengen zwischen 1 und 2 ml in verschließbare Kunststoff-Röhrchen (Eppendorf) pipettiert und bis zur Bestimmung bei -18 °C im Tiefkühlschrank aufbewahrt. Als Standardserum zur Überprüfung der Methode wird eine größere Menge Serum einer Versuchsperson gewonnen und in Portionen von ca. 0,5 ml aufgeteilt. Diese Portionen werden wie die anderen Seren eingefroren.

3.2 CHEMIKALIEN

Folgende Chemikalien werden verwendet:

KH_2PO_4 p.a.	(Fa. Merck)
Na_2HPO_4 x 2 H_2O p.a.	(Fa. Merck)
Norit A, Aktivkohle aus Holz	(Fa. Serva)
Dextran T 500	(Fa. Serva)
Rinder-gamma-Globulin	(Sigma Chemical Comp.)
Humanalbumin	(Behringwerke)
$(NH_4)_2SO_4$ p.a.	(Fa. Merck)
Äthanol p.a.	(Fa. Merck)
Toluol p.a.	(Fa. Merck)

PPO (2,5 Diphenyloxazol) (Packard-Instr.-Comp.)

Dimethyl-POPOP (2,2-p-Phenylen-bis-4-methyl-5-phenyloxyloxazol) (Fa. Merck)

An radioaktiven Substanzen wird verwendet:

5-alpha-Dihydrotestosteron-1,2-^{3}H, spezifische Aktivität 45 Ci/mMol (^{3}H-DHT) (New England Nuclear Corp.)

^{3}H-Toluol (" ")

Zur Verdünnung der Serumprobe wird Phosphatpuffer nach SÖRENSEN mit einem pH von 7,4 folgendermaßen angesetzt: 1,74 g KH_2PO_4 und 9,59 g Na_2HPO_4 x 2 H_2O werden in 1000 ml H_2O aufgelöst. Endogenes Steroid im Serum wird mit einer Suspension aus 200 mg Norit A und 200 mg Dextran T 500 in 100 ml Phosphatpuffer (s.o.) entfernt. Für die Inkubation von ^{3}H-DHT und Probe wird proteinhaltiger Puffer aus 400 mg Humanalbumin und 200 mg Rinder-gamma-Globulin auf 100 ml Phosphatpuffer für jede Bestimmungsserie neu angesetzt. Das ^{3}H-DHT wird in einer radioaktiven Konzentration von 5 uCi/ml in Äthanol verwendet. Bei 4 ^{o}C gesättigte Lösung von $(NH_4)_2SO_4$ in H_2Owird zur Ausfällung der Globulinfraktion benutzt und zur Spülung der Filter auf 50 % Sättigung verdünnt. Zur Bestimmung des Wirkungsgrades von Szintillator und Zähler dient ein Standard, der durch Verdünnung einer ^{3}H-Toluol-Stammlösung (aktuelle Impulsrate 3,27 x 10^{6} dpm/ml) hergestellt wird. Der Flüssigszintillator besteht aus 12,5 g PPO und 250 mg Dimethyl-POPOP auf 2500 ml Toluol.

3.3 GERÄTE

Zentrifugiert wird mit einer Zentrifuge vom Typ U J 2 der Fa. M.Christ. Zur Filtration werden GF/F-Glasfaserfilter (Durchmesser 2,5 cm) der Fa. Whatman in Verbindung mit einem Glasfiltrationsgerät der Fa. Schleicher & Schüll und einer Wasserstrahlpumpe verwendet. An weiteren Geräten wird benutzt: Polystyrol-Röhrchen, Größe 75 x 12 mm der Fa. Sarstedt; Kolbenhubpipetten (Fa. Eppendorf); Absaugglocke (Glaswerk Wertheim) an Wasserstrahlpumpe; Rotamix-Schüttelgerät (Fa. Heidolph); Tiefkühltruhe eingestellt auf -18 °C; Brutschrank eingestellt auf 37 °C; Trockenschrank eingestellt auf 98 °C.

Zur Messung der Radioaktivität kommt der Toluol-Flüssigszintillator zusammen mit der zu messenden Substanz in Polyäthylen-Röhrchen mit Schraubdeckel (Fa. Zinsser). Gezählt wird in einem Szintillations-Spektrometer (Modell 2002 oder 3003 des Tri-carb scintillation spectrometer der Fa. Packard). Der radioaktive "background" beträgt ca. 12 cpm und wird bei der Zählung automatisch abgezogen.

4 METHODE

4.1 VORBEMERKUNGEN

Zur Bestimmung der SHBG-Konzentration im menschlichen Serum wird mit kleinen Abänderungen die von BLANK (1975) entwickelte Methode zur quantitativen Bestimmung des SHBG übernommen. Diese Methode beruht im Prinzip auf der Ammonsulfat-Fällungsmethode von ROSNER (1972). Der hauptsächliche Unterschied besteht darin, daß bei der Zugabe des Tracers zur Probe ein proteinhaltiger Puffer eingesetzt wird und daß ein anderer Weg zur Erhaltung der SHBG-bedingten Radioaktivität für die Zählung führt. Während ROSNER die Globuline (und damit das ^{3}H-DHT-markierte SHBG) nach der Ausfällung abzentrifugiert und die Globulin-gebunden Aktivität aus der Differenz von Totalaktivität minus Aktivität im Überstand erhält, wird bei der hier angewandten Methode der Globulinanteil durch Filtration abgetrennt und die Aktivität direkt auf dem Filter gemessen.

4.2 PRINZIP

Zunächst wird das zu untersuchende Serum soweit verdünnt, daß die Gesamtproteinkonzentration des Ansatzes unter die Proteinkonzentration des verwendeten Puffers zu liegen kommt. Damit ist gewährleistet, daß die Proteinkonzentration von Ansatz zu Ansatz nicht zu stark schwankt

und die unspezifische Adsorbtion von ^{3}H-DHT zuverlässig über den Leerwert (enthält nur ^{3}H-DHT und proteinhaltigen Puffer) eliminiert werden kann.Die Zugabe von Dextran-Kohle-Suspension dient der Entfernung des endogenen Steroids der Probe, das sonst Bindungsstellen des SHBG besetzen würde. Der Tracer - tritiummarkiertes DHT - wird durch Abdampfen des Lösungsmittels an die Wand der Reagenzröhrchen adsorbiert und nach Zugabe der verdünnten Probe und des proteinhaltigen Puffers durch Schütteln wieder in Lösung gebracht. Der proteinhaltige Puffer enthält Humanalbumin und Rinder-gamma-Globulin. Das Albumin soll das gesamte ^{3}H-DHT des Ansatzes in Lösung halten, während das zugesetzte Globulin die Mitfällung auch der kleinsten Mengen Globulin aus der Probe bewirken soll. Eine einstündige Inkubation bei 37 ^{o}C ermöglicht - neben der Bindung des ^{3}H-DHT an Albumine - eine weitgehende Absättigung des DHT-bindenden Globulin (das Ergebnis wird auf 100 % Sättigung korrigiert). Anschliessend wird die Globulinfraktion durch Ammonsulfat ausgefällt, sodaß nur freies und albumingebundenes ^{3}H-DHT in Lösung bleibt. Die Globuline werden dann durch Filtration abgetrennt und die Aktivität des ^{3}H-DHT auf dem Filter direkt gemessen. Über den bei jeder Bestimmungsserie mitgeführten Leerwert wird die unspezifische Aktivität erfaßt. So ist die Differenz der Aktivitäten von Probe und Leerwert ein Maß für die Menge des globulingebundenen ^{3}H-DHT. Da DHT nur an SHBG und nicht an andere steroidbindende Globuline - wie z.B. das CBG -

gebunden wird, ist diese Differenz gleichzeitig ein Maß für die SHBG-Konzentration des untersuchten Serum (der Probe). Nach einer Umrechnung erhält man dann als Ergebnis die SHBG-Konzentration in mg/l.

Sämtliche Angaben dieses Abschnitts sind experimentell belegt in den Arbeiten von BLANK (1975) und ROSNER (1972).

4.3 DURCHFÜHRUNG

In Abb. 1 ist eine schematische Darstellung zur Durchführung der Methode gegeben.

Das tiefgefrorene Serum wird bei Zimmertemperatur aufgetaut und 100 ul davon in ein Reagenzröhrchen pipettiert. Nach Zugabe von 100 ul Dextran-Kohle-Suspension und 800 ul Sörensen-Phosphatpuffer wird geschüttelt und der Ansatz mindestens 12 h bei 4 °C in der Kühlkammer stehengelassen. In dieser Zeit wird einige Male wiederholt geschüttelt. Auf diese Weise werden pro Bestimmungsserie 10 bis 15 Proben angesetzt. Zur Überprüfung der Methode wird bei jeder Serie eine Portion des Standardserums (siehe Abschnitt "Serum-Proben") aufgetaut und wie die Proben behandelt.

Das ^{3}H-markierte DHT ist in Äthanol gelöst vorhanden und wird in einer Menge von 100 ul in Polystyrol-Reagenzröhrchen pipettiert. Zur Entfernung des Lösungsmittels kommen die Röhrchen für etwa 2 h in ein Unterdruck-Absauggerät.

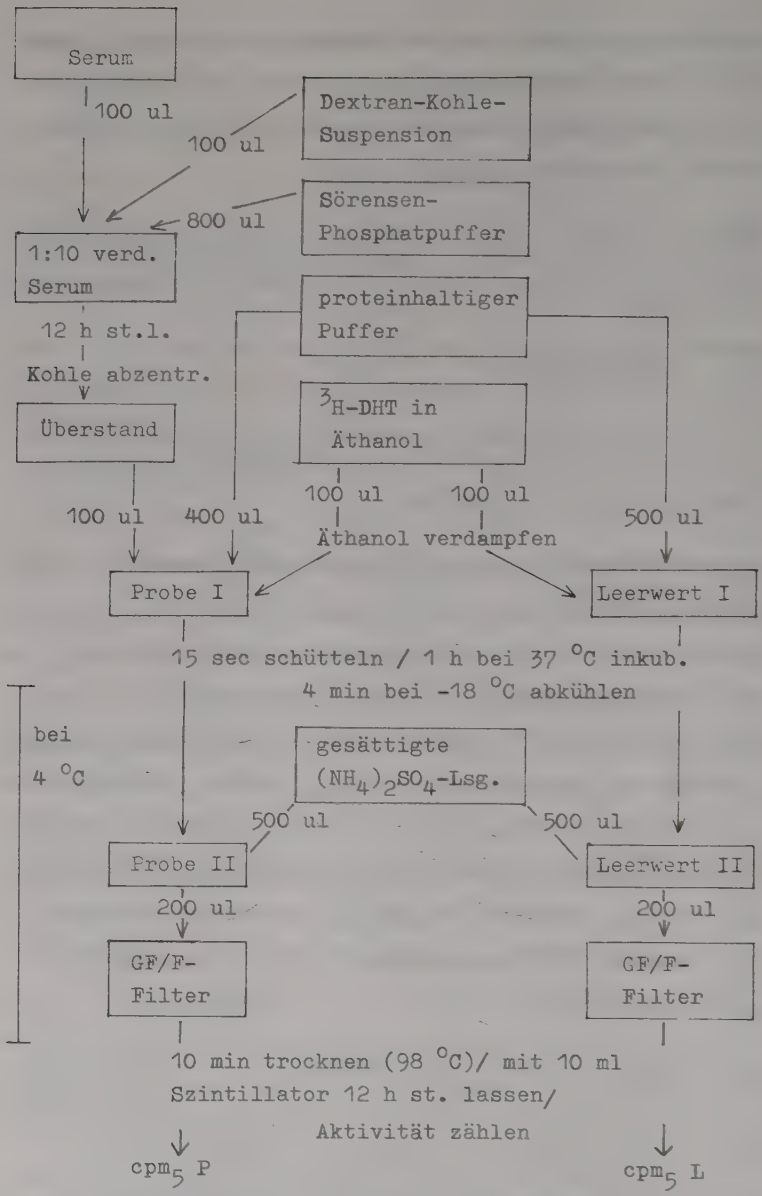

Abb. 1: Schema zur Durchführung der Methode

Die mit Dextran-Kohle versetzten Proben werden 15 min bei ca. 3000 U/min zentrifugiert. Dann werden je 100 ul des Überstandes in ein ^{3}H-DHT enthaltendes Röhrchen gegeben und je 400 ul proteinhaltiger Puffer hinzupipettiert. Das Standardserum und jede Probe werden auf diese Art und Weise dreifach angesetzt (Probe I der Abb.1). Als Leerwert für jede Bestimmungsserie wird außerdem in fünf ^{3}H-DHT enthaltende Röhrchen je 500 ul proteinhaltiger Puffer gegeben (Leerwert I der Abb.). Anschließend werden alle Ansätze etwa 15 sec geschüttelt und dann eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Nach einer vierminütigen Abkühlung bei -18 °C im Tiefkühlschrank erfolgt die weitere Verarbeitung bei 4 °C im Kühlraum. Unter Schütteln werden zu jedem Ansatz 500 ul gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung hinzugegeben. Nach nochmaligem Schütteln wird 5 min bis zur vollständigen Ausbildung eines weißen Niederschlages gewartet und dann wieder geschüttelt. Daraufhin werden je 200 ul von jedem Ansatz (Probe II und Leerwert II der Abb.) auf ein zuvor mit 1 ml 50 %-gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung gespültes Filterscheibchen getropft und mit Unterdruck filtriert. Der Filter wird mit 1 ml 50 %-gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung nachgewaschen und in ein Zählröhrchen gesteckt.

Zur Trocknung kommen die Zählröhrchen mit den Filterscheibchen für 10 min in einen auf 98 °C eingestellten

Trockenschrank. Anschließend wird der Flüssigszintillator in einer Menge von 10 ml hinzugegeben, jedes Zählröhrchen mit Schraubdeckel verschlossen und mindestens 12 h bei Zimmertemperatur stehengelassen. Schließlich mißt man in einem der oben angeführten Zähler je Ansatz zweimal für 5 min die Aktivität und erhält jeweils die Anzahl der Zählimpulse pro 5 min (counts per 5 minutes = cpm_5). Für die 5 Leerwerte (10 Werte) und die drei zu einer Probe gehörenden Ansätze (6 Werte) wird dann der Mittelwert errechnet.

4.4 BERECHNUNG

Die Berechnung des Endergebnisses geschieht nach der von BLANK (1975) angegebenen Formel, die davon ausgeht, daß ein Molekül SHBG nur eine Bindungsstelle für Steroide besitzt (siehe "Einleitung"). Die Formel lautet:

$$\text{SHBG (mg/l)} = \frac{(\text{cpm P} - \text{cpm L}) \times \text{MG} \times f_v \times 10^4}{\text{SA} \times \text{K} \times \text{eff}}$$

Es bedeuten:

cpm = counts per minute
cpm P = Mittelwert der Probe-Ansätze
cpm L = Mittelwert der Leerwert-Ansätze
MG = Molekulargewicht in mg
f_{v_4} = Faktor für die Verdünnung der Probe
10^4 = Umrechnung der vorgelegten 100 ul auf 1 l
SA = spezif. Aktivität des ^{3}H-DHT in dpm/Mol
K = Korrekturfaktor auf 100 % Steroidsättigung
eff = efficiency von Szintillator und Zähler

Die spezifische Aktivität wird aus den Angaben des Herstellers des ^{3}H-DHT ermittelt und beträgt 10^{17} dpm/Mol (entsprechend 45 Ci/mMol). Der Korrekturfaktor K berücksichtigt den Umstand, daß aus praktischen Gründen nicht im Bereich von 100 % Steroid-Sättigung gearbeitet werden kann. Um eine solche Sättigung zu erreichen, müßte zuviel ^{3}H-DHT vorgelegt werden. Daraus würden bei der Zählung zu hohe cpm_5-Werte resultieren, die bei der Bildung der Differenz cpm_5 P - cpm_5 L zu zu starken Schwankungen der Ergebnisse führen würden. Für SHBG-Konzentrationen zwischen 1 und 20 mg/l, wie sie im Serum der untersuchten Personen vorkommen, hat es sich als günstig erwiesen, mit einer Steroid-Sättigung von 90 % zu arbeiten. Zur Korrektur wird deshalb ein Faktor K = 0,9 in den Nenner der obigen Formel eingesetzt (BLANK, nicht veröffentlicht). Nach Einsetzen der entsprechenden Werte lautet die Formel dann:

$$\text{SHBG (mg/l)} = \frac{\text{cpm (P - L)} \times 1{,}15 \times 10^{8} \times 10 \times 10^{4}}{10^{17} \times 0{,}9 \times \text{eff}}$$

Da nur ein Fünftel des Gesamtansatzes (1 ml nach Zugabe der Ammoniumsulfat-Lösung), nämlich 200 ul filtriert werden und zur Zählung kommen, kann der Wert für 5-Minuten-Zählung (cpm_5) ohne Kürzung in die Formel eingesetzt werden. Bis auf die zu bestimmenden Werte ausgerechnet, ergibt sich so folgende Formel zur Bestimmung des SHBG-Gehaltes der Probe:

$$\text{SHBG (mg/l)} = \frac{\text{cpm}_5 \text{ (P - L) x 1,28 x } 10^{-4}}{\text{eff}}$$

Der Wirkungsgrad (efficiency), hier als Dezimalbruch angegeben, liegt für den einen Zähler (Modell 2002) um 0,42 und für den anderen (Modell 3003) um 0,28. Er wird dadurch bestimmt, daß zu 10 ml Szintillationsflüssigkeit eine 6-fache Verdünnung der ^{3}H-Toluol-Stammlösung in einer Menge von 100 ul gegeben wird. Dieser Ansatz wird 5 min gezählt (=cpm_5) und die gezählte Impulsrate zur berechneten aktuellen Impulsrate (dpm_5) in Beziehung gesetzt. Der für jeden Szintillatoransatz neu ermittelte Wirkungsgrad eff = $\text{cpm}_5/\text{dpm}_5$ wird dann in obige Formel eingesetzt.

4.5 STATISTISCHE METHODEN

Zur Überprüfung der Methode innerhalb einer Bestimmungsserie wird für die 3 Ansätze des Standardserums und für die 5 Leerwerte jeweils der Mittelwert, die Standardabweichung der Stichproben und der zugehörige Variationskoeffizient bestimmt.

Bei der Auswertung der Ergebnisse (SHBG in mg/l) werden diese in Gruppen (nach Pubertätsstadien bzw. Erkrankungen) zusammengefaßt und zu jeder Gruppe der Mittelwert berechnet. Auch hier wird die Standardabweichung der Stichproben ermittelt; hinzu kommt die Berechnung der Standardabweichung des Mittelwertes und die Prüfung des Unterschiedes nach dem sog. Student-Test. Bestimmt wird

damit der p-Wert, d.h. die Wahrscheinlichkeit, mit der der Unterschied der Mittelwerte auf Zufall beruht. Wenn dieser p-Wert unter 0,05 liegt, wird der Unterschied als "signifikant" betrachtet, ist er hingegen größer als 0,05, dann ist der Unterschied "nicht signifikant".

Folgende Symbole finden bei der Darstellung Verwendung:

n = Anzahl der Stichproben
$\bar{x}$ = arithmetischer Mittelwert
s_x = Standardabweichung der Stichproben
$s_{\bar{x}}$ = Standardabweichung des Mittelwertes
v = Variationskoeffizient
p = Unterschiedswahrscheinlichkeit
s = signifikant
ns = nicht signifikant

4.6 BEURTEILUNG DES TRF-TESTES

Bei 15 der 17 Kinder mit Schilddrüsen-Störungen ist gleichzeitig mit der SHBG-Bestimmung ein TRF-Test durchgeführt worden. SHBG ist im Nüchternserum (d.h. noch ohne TRF-Verabreichung) bestimmt worden.

Beim TRF-Test wird die Hypophyse mit synthetischem Thyreotropin-Releasing-Faktor (=TRF) stimuliert und die Konzentration des Thyreotropin (TSH) im Plasma radioimmunologisch gemessen; diese Messung wird nüchtern (d.h. vor Stimulation mit TRF) und jeweils 10, 20, 30, 60, 90 und 120 Minuten nach der Stimulation durchgeführt. Von einem im Normbereich liegenden TRF-Test wird gesprochen,

wenn alle Meßwerte innerhalb eines bestimmten Bereiches liegen. Dieser Bereich ist in Abb. 2 eingezeichnet (Schraffur) und stellt die bei gesunden Personen gemessenen Werte dar (nach FLEISCHER et al 1972). Wird ein zu hoher Nüchtern-TSH-Spiegel festgestellt und folgt ihm ein extremer und eventuell verzögerter Anstieg der TSH-Werte nach der TRF-Stimulation, lenkt der TRF-Test den Verdacht auf eine primäre Hypothyreose. Einen negativen TRF-Test, bei dem alle gemessenen TSH-Werte an der unteren Nachweisgrenze liegen, beobachtet man bei unterdrückter TSH-Ausschüttung der Hypophyse. Dies ist der Fall bei jeder ausreichenden Substitution mit Thyroxin, aber auch bei Hyperthyreosen (z.B. autonomes Schilddrüsenadenom) und bei Hypophysen-Unterfunktion (z.B. Panhypopituitarismus).

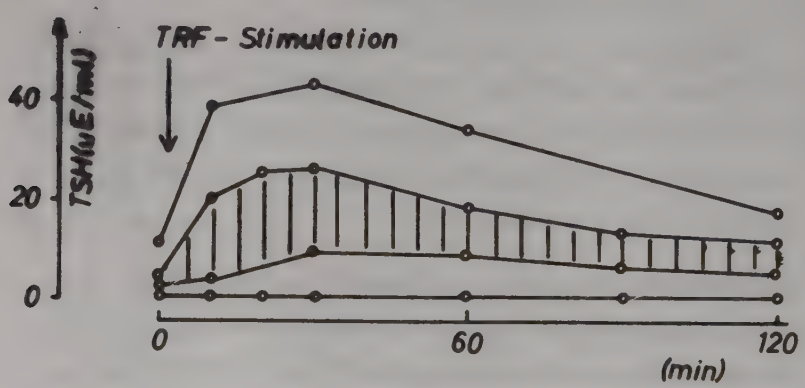

Abb.2: Plasmakonzentration des TSH nach TRF-Stimulation

schraffierte Fläche: Normbereich
untere Kurve: negativer TRF-Test
obere Kurve: erhöhte TSH-Werte

Ordinate: Konzentration in uE/ml
Abszisse: Zeit nach Stimulation in Minuten

5 ERGEBNISSE

5.1 ÜBERPRÜFUNG DER METHODE

Jedes Ergebnis ist aus drei Einzelmessungen ermittelt, der Leerwert einer Bestimmungsserie aus fünf Einzelmessungen. Der Mittelwert $\bar{x}$ dieser Messungen wird bei der Berechnung der SHBG-Serumkonzentration verwendet, während die Standardabweichung s_x und der zugehörige Variationskoeffizient v eine Aussage über die arbeitstechnisch bedingten Schwankungen erlauben; denn den drei Einzelmessungen liegt dieselbe verdünnte Serumprobe zugrunde und der Leerwert wird fünffach mit einer konstanten Menge Puffer angesetzt. Bei den Leerwerten beträgt der Variationskoeffizient durchschnittlich 5,5 % (Extremwerte: 2,8 % und 8,9 %) und bei den Messungen des Standardserums 3,8 % (Extremwerte: 1,3 % und 6,9 %).

Eine Aussage über die Reproduzierbarkeit der Methode ist durch die Bestimmung der SHBG-Konzentration im Standardserum bei mehreren Bestimmungsserien und durch die Mehrfachbestimmung des SHBG eines Serums in einer Serie möglich. Ersteres wird als Reproduzierbarkeit "von Serie zu Serie" bezeichnet, letzteres als Reproduzierbarkeit "innerhalb der Serie". Wie Tabelle 1 zeigt, liegt der Variationskoeffizient mit v = 19,8 % bzw. v = 19,1 % für beide Überprüfungsarten in derselben Größenordnung.

	Reproduzierbarkeit von Serie zu Serie	Reproduzierbarkeit innerhalb der Serie
n	12	6
min	2,2 mg/l	3,4 mg/l
max	4,9 mg/l	5,4 mg/l
$\bar{x}$	3,63 mg/l	4,50 mg/l
s_x	0,72 mg/l	0,86 mg/l
$s_{\bar{x}}$	0,21 mg/l	0,35 mg/l
v	19,8 %	19,1 %

Tabelle 1 : Reproduzierbarkeit der Methode

5.2 SHBG-BESTIMMUNG BEI MÄDCHEN WÄHREND DER PUBERTÄT

Die Einzelwerte der SHBG-Bestimmungen sind in Tabelle 2 und 3 aufgeführt. Tabelle 4 zeigt die statistische Auswertung in fünf Gruppen eingeteilter Einzelwerte von Mädchen in der Pubertät und der zum Vergleich herangezogenen Werte von erwachsenen Frauen (E = Erwachsene). In Abb. 3 und 4 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.

Es zeigt sich, daß die mittlere SHBG-Konzentration im Serum bei Mädchen während der Pubertät absinkt. So liegt nach der vorliegenden Untersuchung die durchschnittliche SHBG-Konzentration bei Mädchen im Pubertätsstadium P 1 mit 8,8 mg/l etwa doppelt so hoch wie die bei Mädchen im Pubertätsstadium P 5 mit 4,0 mg/l. Kein Unterschied

hingegen besteht zwischen Mädchen im Stadium P 5 und erwachsenen Frauen: mit 4,0 mg/l haben erwachsene Frauen eine durchschnittlich gleich hohe SHBG-Konzentration wie Mädchen am Ende der Pubertät. In den Pubertätsstadien P 2 , P 3 und P 4 liegen die mittleren SHBG-Konzentrationen mit den Werten 7,2 mg/l , 6,3 mg/l bzw. 6,4 mg/l relativ eng beisammen und in der Höhe zwischen den oben genannten Werten der P 1 - Mädchen und P 5 - Mädchen.

Für jede der sechs Gruppen (P 1 bis P 5 und E) ist eine Prüfung des Unterschiedes zu den anderen Gruppen nach dem t-Test durchgeführt worden. Wie Tabelle 5 zeigt, ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen P 1 , P 2 und P 3 einerseits und den Gruppen P 5 und E andrerseits, wie auch zwischen P 4 und E.

In den Abbildungen sind die Einzelergebnisse einmal nach Gruppen geordnet (Abb.3) und einmal gegen das chronologische Alter (Abb.4) aufgetragen. In Abb.3 ist der Mittelwert $\bar{x}$ der einzelnen Gruppen als Querstrich eingezeichnet. Aus Abb.4 ist keine deutliche Abhängigkeit der SHBG-Konzentration im Serum vom chronologischen Alter der untersuchten Personen ersichtlich (z.B. im Sinne einer Abnahme der SHBG-Konzentration mit zunehmendem Alter). Deutlich wird lediglich, daß die Werte der Mädchen von 6 bis 16 Jahren durchschnittlich höher liegen als die Werte der erwachsenen Frauen.

Nr.	P 1		P 2		P 3		P 4		P 5	
	Alter (J.)	SHBG (mg/l)	Alter (J.)	SHBG (mg/l)	Alter (J.)	SHBG (mg/l)	Alter (J.)	SHBG (mg/l)	Alter (J.)	SHBG (mg/l)
1	6	12,7	9	6,2	11	6,2	12	2,9	12	1,9
2	6	10,7	11	12,3	11	2,9	13	7,8	13	2,9
3	6	6,4	11	6,2	12	9,1	13	2,1	13	2,8
4	7	9,6	11	5,4	12	6,7	14	7,8	14	5,4
5	7	8,8	11	3,5	13	9,2	14	7,6	14	5,2
6	8	10,9	12	7,9	13	6,4	14	4,4	14	4,6
7	9	5,1	12	7,8	13	3,8	15	11,6	14	3,5
8	10	9,0	12	6,9			16	6,7	15	5,4
9	10	6,3	14	8,9						

Tabelle 2 : Einzelergebnisse der SHBG-Bestimmungen

Mädchen, 6 - 16 Jahre, eingeteilt in Reifestadien P 1 - P 5

Nr.	Alter (J.)	SHBG (mg/l)	Nr.	Alter (J.)	SHBG (mg/l)
1	17	9,1	14	35	4,3
2	17	8,0	15	35	2,7
3	21	2,6	16	36	4,0
4	22	0,9	17	36	1,0
5	22	1,1	18	38	5,2
6	23	5,6	19	39	4,6
7	23	4,9	20	39	2,2
8	27	3,7	21	40	1,3
9	29	2,8	22	43	9,9
10	32	3,8	23	43	3,5
11	32	2,8	24	43	1,5
12	33	5,2	25	44	6,9
13	34	4,1	26	45	1,8

Tabelle 3 : Einzelergebnisse der SHBG-Bestimmungen

Frauen, 17 - 45 Jahre

Stadium	n	Alter (Jahre)	$\bar{x}$ (SHBG in mg/l)	s_x	$s_{\bar{x}}$	v (%)
P 1	9	6 - 10	8,8	2,5	0,8	28,2
P 2	9	9 - 14	7,2	2,5	0,8	34,0
P 3	7	11 - 13	6,3	2,4	0,9	37,7
P 4	8	12 - 16	6,4	3,1	1,1	48,7
P 5	8	12 - 15	4,0	1,4	0,5	34,4
E	26	17 - 45	4,0	2,5	0,5	62,7

Tabelle 4 : Statistische Auswertung

	P 2	P 3	P 4	P 5	E
P 1	ns	ns	ns	$p < 0,001$	$p < 0,001$
P 2		ns	ns	$p < 0,01$	$p < 0,01$
P 3			ns	$p < 0,05$	$p < 0,05$
P 4				ns	$p < 0,05$
P 5					ns

Tabelle 5 : Prüfung des Unterschiedes nach dem t-Test (Studenttest)

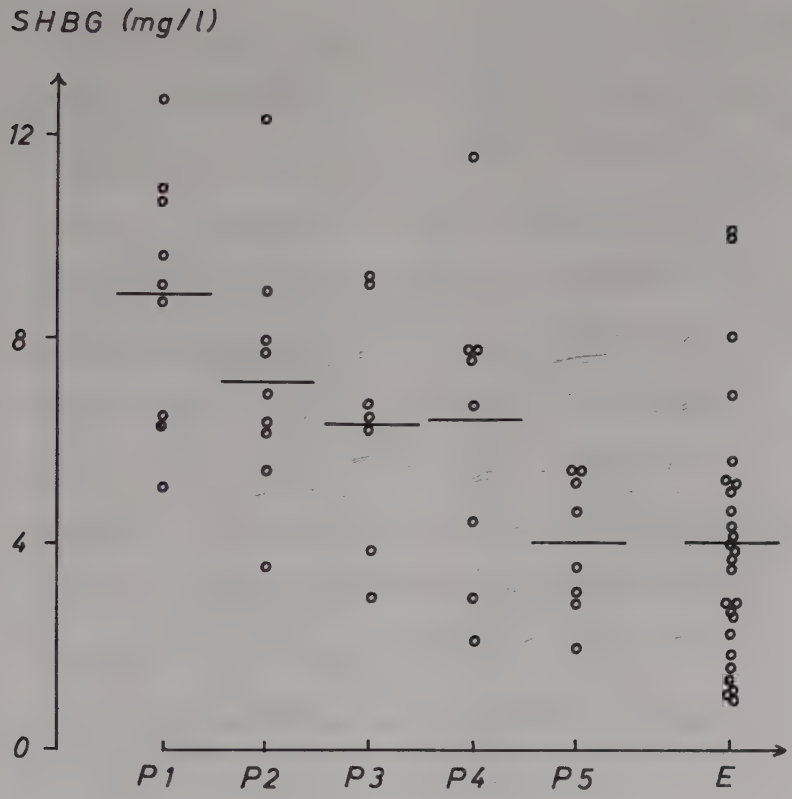

Abb.3 : Einzelergebnisse der SHBG-Bestimmung und Mittelwert $\bar{x}$ bei Mädchen in den fünf Pubertätsstadien und bei erwachsenen Frauen.

Ordinate: Konzentration in mg/l
Abszisse: Pubertätsstadien P 1 - P 5 und Erwachsenengruppe E

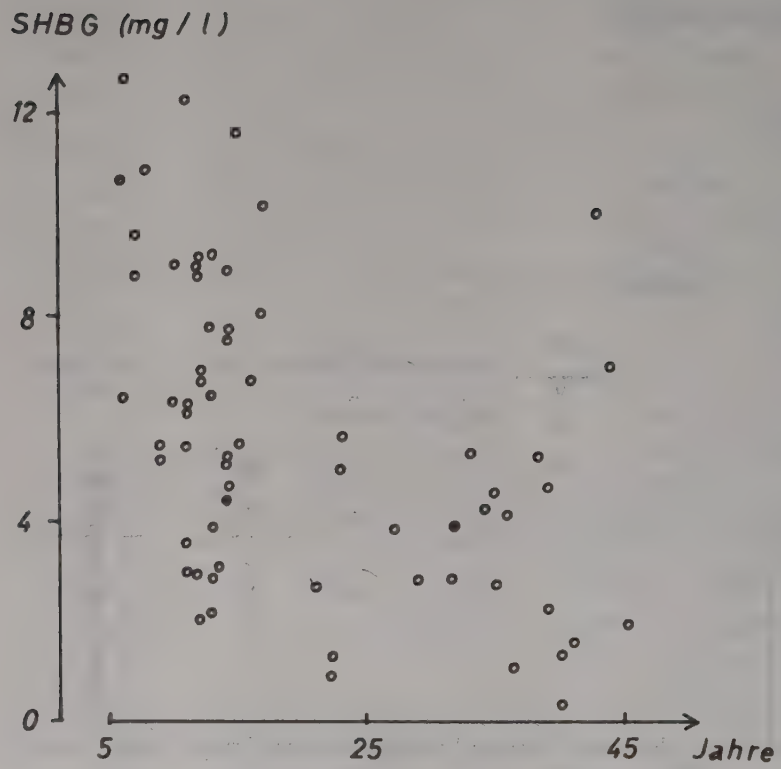

Abb.4 : Einzelergebnisse der SHBG-Bestimmung bei Mädchen und Frauen in Abhängigkeit vom chronologischen Alter.

Ordinate: Konzentration in mg/l
Abszisse: Alter in Jahren

5.3 SHBG-BESTIMMUNG BEI KINDERN MIT VERSCHIEDENEN ENDOKRINOPATHIEN

In 26 Fällen ist die SHBG-Konzentration im Serum bestimmt worden. Die Tabellen 6 und 7 zeigen Alter und Geschlecht (w = weiblich, m = männlich), Diagnose, Therapie und das Ergebnis der SHBG-Bestimmung in den einzelnen Fällen. In der Spalte "SHBG (mg/l) der Altersgruppe" ist diejenige SHBG-Konzentration aufgeführt, die durchschnittlich mit der hier angewandten Methode bei Kindern in derselben Altersgruppe wie der betrachtete Einzelfall gemessen worden ist. Da das Pubertätsstadium - außer in zwei Fällen - nicht bestimmt worden ist, sind die Durchschnittswerte der Pubertätsstadien angegeben, in denen sich die Kinder jeweils dem Alter nach befinden könnten.Bei Kindern in der Pubertät sind Mittelwerte, die drei Pubertätsstadien einschließen, eingetragen, bei Kindern vor der Pubertät der Mittelwert des P 1 - Stadiums. Dabei liegen die Daten für Mädchen aus der vorliegenden Arbeit und die für Jungen aus der Arbeit von BLANK und Mitarbeitern (in Druck) zugrunde.

5.3.1 Kinder mit Schilddrüsenerkrankungen

Bei 15 Kindern ist zu der Bestimmung des SHBG im Serum ein TRF-Test durchgeführt worden. Die Charakterisierung des Testergebnisses nach den im Kapitel "Methode" beschriebenen Richtlinien ist in Tabelle 6 mit aufgenommen.

Die Tabelle ist in vier Teile eingeteilt :

Im ersten Teil sind die Kinder zusammengefaßt, deren TRF-Test im Normbereich liegt und bei denen ein Verdacht auf eine Hypothyreose dadurch nicht bestätigt ist. Die SHBG-Konzentrationen sind bei diesen Kindern ungefähr altersentsprechend, bei einigen jedoch etwas niedriger.

Im zweiten Teil sind die Kinder aufgeführt, bei denen der TRF-Test eine (primäre) Hypothyreose wahrscheinlich macht, die aber noch keine Substitutionsbehandlung mit Schilddrüsenhormon bekommen. Hier sind die SHBG-Konzentrationen in allen Fällen - und z.T. erheblich - niedriger als bei Kindern der entsprechenden Altersgruppe.

Der dritte Teil zeigt diejenigen Fälle, wo eine Hypothyreose bzw. eine Athyreose gesichert ist und eine Substitutionsbehandlung durchgeführt wird. Der TRF-Test ist bei allen negativ und der SHBG-Spiegel im Serum in allen Fällen höher als in der Altersgruppe erwartet.

In den beiden Fällen im vierten Teil der Tabelle ist ein TRF-Test nicht gemacht worden. Bei dem einen handelt es sich um eine Hypothyreose, die substituiert wird, beim anderen um eine Hyperthyreose, die kombiniert mit Thyreostatika und Hormon-Substitution behandelt wird. Beidemale ist die SHBG-Serumkonzentration höher als bei gleichaltrigen Kindern.

Name	Geschl.	Alter (Jahre)	Diagnose	Therapie	TRF-Test	SHBG (mg/l)	SHBG(mg/l) der Altersgr.
P.R.	w	13 0/12	-	-	im Normbereich	1,5	4,0 - 6,3
C.D.	w	12 7/12	-	-	im Normbereich	4,3	4,0 - 6,3
C.C	w	8 3/12	Struma	-	im Normbereich	9,1	8,8
A.B.	w	9 0/12	Struma	-	im Normbereich	4,5	8,8
U.K.	w	13 3/12	Struma	Jodit	im Normbereich	2,6	4,0 - 6,3
J.K.	m	12 2/12	Struma	Jodit	im Normbereich	5,2	3,0 - 5,6
F.K.	m	9 2/12	Struma	Jodit	im Normbereich	5,3	7,7
B.E.	w	14 2/12	Hypothyreose	-	erhöhte TSH-Werte	1,3	4,0 - 6,3
G.F.	w	12 9/12	Hypothyreose	-	erhöhte TSH-Werte	0,8	4,0 - 6,3
U.D.	w	9 2/12	Hypothyreose	-	erhöhte TSH-Werte	7,4	8,8
G.St.	m	4 9/12	Hypothyreose	-	erhöhte TSH-Werte	3,9	7,7
A.S.	w	10 4/12	Hypothyr.	Substitution	negativ	12,4	6,3 - 8,8
M.W.	m	3 3/12	Hypothyr.	Substitution	negativ	14,2	7,7
K.Sch.	w	2 0/12	Athyreose	Substitution	negativ	16,7	8,8
T.G.	w	11 3/12	Hypothyr.u. Minderwuchs	Substit. mit Thyroxin u.STH	negativ	11,6	6,3 - 8,8
A.B.	w	11 6/12	Hypothyr.	Substitution	-	8,9	6,3 - 7,2
D.L.	m	11 0/12	Hyperthyr.	Thyreostatika u.Substit.	-	9,9	4,8 - 7,7

Tabelle 6 : Ergebnisse bei Kindern mit Thyreosen. Nähere Erklärung im Text.

5.3.2 Kinder mit weiteren Endokrinopathien

Die Ergebnisse und Daten sind in Tabelle 7 dargestellt. In zwei Fällen von Pubertas praecox im Stadium P 3 bei Mädchen ist das Serum-SHBG bestimmt worden. Im Fall der B.W. ist die SHBG-Konzentration - verglichen mit anderen Mädchen in P 3 - bei beiden Messungen zu hoch, während bei C.B. eine zu niedrige Konzentration gefunden wird. Einen zu niedrigen SHBG-Spiegel hat auch ein 7-jähriges Mädchen mit Hypertrichose und einer leichten Erhöhung der Plasma-Androgene. Bei den Jungen mit Gynäkomastie zeigt sich einmal ein zu hoher SHBG-Spiegel gegenüber gleichaltrigen Jungen (G.R.), das andere Mal liegt der SHBG-Spiegel auf etwa altersentsprechender Höhe (A.L.). Die beiden Mädchen mit adreno-genitalem Syndrom (AGS) unter Therapie haben niedrigere SHBG-Konzentrationen als durchschnittlich Mädchen in ihrem Alter. M.B.,dessen Morbus Addison mit Hydrocortison behandelt wird, zeigt keinen Unterschied in der Höhe des SHBG-Spiegels zu Jungen in den letzten Pubertätsstadien. Extrem hoch ist das Serum-SHBG bei H.M., von dem ein hypophysärerer Minderwuchs mit einer Erniedrigung des Plasmaspiegels des Wachstumhormons (Somatotropes Hormon = STH) bekannt ist und der noch keine Therapie erhält.

Name	Geschl.	Alter (Jahre)	Diagnose	Therapie	SHBG (mg/l)	SHBG(mg/l) der Altersgr.
B.W.(1)	w	8 0/12	Pub.praec.,P 3,Knochenalter 11 1/2 J.	Cyproteronacetat	11,2	6,3
B.W.(2)	w	9 3/12	s.o.,Knochenalter 12 J. Testosteron i.Pl.27,2 ng/100 ml	s.o.	8,2	6,3
C.B.	w	10 6/12	Pub.praec.,P 3,Testosteron im Plasma 37,5 ng/100 ml	Cyproteronacetat	4,1	6,3
M.M.	w	7 0/12	Hypertrichose, leichte Erhöhung der Androgene i.Pl.	keine	4,0	8,8
G.R.	m	11 7/12	Gynäkomastie	keine	10,0	4,8 - 7,7
A.L.	m	13 3/12	Gynäkomastie	keine	3,8	3,0 - 5,6
D.D.	w	4 0/12	AGS mit Salzverlust	Hydrocortison	5,8	8,8
U.F.	w	12 2/12	AGS	Hydrocortison	3,7	4,0 - 6,4
M.B.	m	13 8/12	Morbus Addison	Hydrocortison	4,2	3,0 - 4,8
H.M.	m	7 9/12	hypophysärer Minderwuchs STH i.Pl. erniedrigt	keine	17,7	7,7

Tabelle 7 : Ergebnisse bei Kindern mit Endokrinopathien verschiedener Art. Nähere Erklärung im Text.

5.4 SHBG-BESTIMMUNG BEI MÄNNERN MIT PROSTATA-ERKRANKUNGEN

Die in Gruppen zusammengefaßten Ergebnisse der SHBG-Bestimmungen werden wie in 5.2 statistisch ausgewertet. Dabei zeigt sich, daß Männer mit Prostata-Adenomen und Prostata-Karzinomen (Gruppe I, II und III) durchschnittlich etwas höhere SHBG-Serumkonzentrationen haben als gesunde Männer gleichen Alters (Gruppe IV). Jedoch unterscheiden sich die Mittelwerte $\bar{x}$ der vier Gruppen in keinem Fall signifikant voneinander. In Tabelle 8 sind $\bar{x}$, s_x, $s_{\bar{x}}$, n und v für jede Gruppe eingetragen. Bei der Auswertung sind diejenigen Seren nicht berücksichtigt, in denen mit der hier angewandten Methode kein SHBG nachweisbar ist, weil die Differenz P - L (siehe Kapitel "Methode") Null oder negative Werte ergeben hat. Dies ist in vier Fällen vorgekommen und in Tabelle 9, die die Einzelmessungen zeigt, mit x gekennzeichnet.

	n	$\bar{x}$	s_x SHBG (mg/l)	$s_{\bar{x}}$	v (%)
I	24	3,5	1,6	0,3	46,9
II	9	3,2	1,3	0,4	40,1
III	32	4,1	3,4	0,6	83,9
IV	18	2,7	1,5	0,4	56,5

Tabelle 8 : Statistische Auswertung der Ergebnisse bei Männern mit Prostata-Erkrankungen
Gruppe I - IV, siehe Angabe bei Tabelle 9

Nr.	SHBG (mg/l)			
	I	II	III	IV
1	x	1,3	3,6	1,7
2	3,3	1,1	12,6	1,1
3	1,9	4,7	4,8	4,6
4	4,6	2,9	5,5	5,4
5	5,7	3,3	2,6	3,1
6	5,1	4,5	4,6	2,0
7	4,9	3,9	2,8	x
8	0,7	3,1	5,1	2,5
9	4,4	4,0	2,4	2,1
10	3,9		3,0	3,1
11	2,8		4,2	2,0
12	6,9		3,6	5,2
13	0,4		3,8	2,0
14	4,3		4,6	5,5
15	3,5		3,2	1,9
16	4,4		1,6	2,8
17	2,9		0,5	2,5
18	3,8		17,9	0,8
19	2,2		0,3	0,5
20	x		x	
21	1,7		2,7	
22	4,5		1,2	
23	2,7		2,7	
24	1,1		3,5	
25	5,4		3,7	
26	3,1		0,4	
27			1,8	
28			1,4	
29			6,1	
30			5,5	
31			4,5	
32			3,8	
33			5,5	

Tabelle 9 : Einzelergebnisse der SHBG-Bestimmung im Serum von Männern über 50 Jahren in mg/l.

Nr. = Nummer der Serumprobe

x = kein SHBG nachweisbar

Gruppe I : Männer mit Prostata-Adenomen

Gruppe II : Männer mit Prostata-Karzinomen

Gruppe III: Männer mit Prostata-Karzinomen

Gruppe IV : Kontrollgruppe (gesunde Männer)

6 DISKUSSION

6.1 DISKUSSION DER METHODE

Obwohl jede Probe dreifach bestimmt wird und dabei die einzelnen Meßergebnisse nicht sehr stark variieren (erreichter Variationskoeffizient bei der Bestimmung des Standardserum durchschnittlich 3,8 %), ist die Methode nicht so präzise, wie man es danach erwarten würde. Denn bei der Mehrfachbestimmung des Standardserum in einer Serie und von Serie zu Serie zeigt sich ein Variationskoeffizient von v = 19,1 bzw. v = 19,8 %. Bei dieser Mehrfachbestimmung ist jede Portion des Standardserum für sich mit Dextran-Kohle behandelt worden, während bei der jedesmal durchgeführten Dreifach-Bestimmung das verdünnte Serum erst nach der Dextran-Kohle-Behandlung in drei Proben aufgeteilt worden ist. Dies führt zu der Vermutung, daß in der Zeit der Dextran-Kohle-Behandlung die SHBG-Aktivität mehr oder weniger stark beeinflußt wird. Bestärkt wird diese Annahme durch die Ergebnisse von ROSNER u.Mitarb. (1974, 1975a,b), die bei der Entwicklung der hier beschriebenen Methode noch nicht vorgelegen haben. Sie zeigen auf, daß mit Ca^{2+}-haltigen Puffern die SHBG-Aktivität optimal erhalten wird, und daß während der Dextran-Kohle-Behandlung des Serum auch endogenes Kalzium in unterschiedlicher Menge entfernt wird. Werden nun keine Ca^{2+}-haltigen Puffer verwendet, könnte die SHBG-Aktivität im Ansatz je nach der

Menge des entfernten endogenen Kalzium verschieden stark beeinträchtigt werden. Bei Temperaturen von 4 °C und kurzfristig höheren Temperaturen (20°C) ist diese Beeinträchtigung zwar nicht sehr stark (Halbwertszeit des aktiven SHBG in Ca^{2+}-freiem Puffer nach ROSNER et al 1974: bei 4 °C 197 h, bei 30 °C 7 h), könnte aber doch die Schwankungen der Meßergebnisse bei den Mehrfachbestimmungen mitbewirken. ROSNER (1972), TULCHINSKY und CHOPRA (1973) sowie ANDERSON et al (1976) wenden bei ihren Methoden die Dextran-Kohle-Behandlung der Seren nicht an. Bei der Mehrfachbestimmung eines Serum geben TULCHINSKY und CHOPRA (1973) einen Variationskoeffizient von 12 % an, ROSNER (1972) erreicht mit seiner Methode einen Variationskoeffizient von 9,6 %.

Die hier angewandte Methode ist meines Erachtens hinreichend genau, um Aussagen gemäß der Zielsetzung dieser Arbeit zu machen und bietet den Vorteil einer einfachen Durchführbarkeit. Mit ihr sind quantitative Bestimmungen des SHBG im Serum auch in Einzelfällen möglich und können zur Klärung bestimmter Krankheitsbilder herangezogen werden (siehe Abschnitt 6.3). Angemerkt sei noch, daß die Angabe der Ergebnisse in mg/l theoretisch errechnet ist und eventuell einer Korrektur bedarf, wenn die Methode standarisiert werden kann. Dies ist nicht möglich, da bisher noch kein reines, isoliertes SHBG zur Standarisierung erhältlich ist.

6.2 SHBG BEI MÄDCHEN IN DER PUBERTÄT

Zunächst sollen die mittleren SHBG-Konzentrationen im Serum von Mädchen in den verschiedenen Pubertätsstadien mit denen von Jungen verglichen werden. Dabei liegen die Daten der Jungen aus der Arbeit von BLANK u.Mitarb. (in Druck) vor. In Abb. 5 sind die mittleren Serumkonzentrationen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von Jungen und Mädchen gegen die Pubertätsstadien aufgetragen. Es zeigt sich, daß Jungen in allen Pubertätsstadien eine niedrigere SHBG-Konzentration im Serum haben als die Mädchen im entsprechenden Pubertätsstadium. Betrachtet man dabei die mittleren SHBG-Spiegel im Serum von erwachsenen Frauen und Männern mit, so weisen Jungen von der Vorpubertät bis zum Erwachsensein einen steileren Abfall des SHBG im Serum auf als Mädchen : bei Jungen fällt das SHBG im Serum von 7,7 mg/l im Stadium P 1 auf 1,9 mg/l im Erwachsenenstadium (in Prozenten: von 100 % auf 24,7 %); bei Mädchen fällt es von 8,8 mg/l (100 %) in P 1 auf 4,0 mg/l (45,5 %) im Erwachsenenstadium.

Diese Ergebnisse stimmen gut mit den von AUGUST et al (1969) gefundenen Ergebnissen überein, die auf der Bestimmung der Testosteron-Bindungsaffinität (TBA) des Plasmas beruhen : sie finden bei Mädchen vor der Pubertät durchschnittlich eine etwa um 20 % höhere TBA als bei Jungen vor der Pubertät, und bei Frauen eine um ca. 50 % höhere TBA als bei Männern. TULCHINSKY und CHOPRA

(1973) allerdings stellen mit ihrer Methode bei 5 - 15 Jahre alten Mädchen im Mittel niedrigere SHBG-Konzentrationen fest als bei erwachsenen Frauen, jedoch bei 5 -15 Jahre alten Jungen eine höhere als bei erwachsenen Männern. GUPTA et al (1975c) haben die prozentuale Testosteronbindung des Plasmas bei Kindern in den verschiedenen Pubertätsstadien bestimmt und finden bei Mädchen einen leichten Anstieg, bei Jungen dagegen einen deutlichen Abfall von P 1 bis zum Erwachsenenstadium (siehe auch "Einleitung").

Um einen Überblick über das Verhalten der Plasmakonzentrationen der wichtigsten Sexualhormone und der Serumkonzentration des SHBG im Verlauf der Pubertät bei Mädchen zu erhalten, sind in Abb. 6 die mittleren Plasmakonzentrationen von Östradiol, Testosteron und 5-alpha-Dihydrotestosteron (DHT) gleichzeitig mit der mittleren Serumkonzentration des SHBG gegen die Pubertätsstadien aufgetragen. Die Mittelwerte der Hormonspiegel entstammen der Arbeit von RAAF (1974), die graphische Darstellung geschieht in Anlehnung an die Arbeiten von GUPTA et al (1975 b,c). Dabei zeigt sich, daß während der weiblichen Sexualentwicklung das Plasma-Östradiol am steilsten und am stärkstem ansteigt (etwa 12-fach). Demgegenüber steigen Testosteron und DHT etwa auf das Dreifache. In allen Stadien hat Testosteron die höchste Absolutkonzentration in ng/100ml, dies ist aber ein Bruchteil der mittleren Testosteronkonzentration von Jungen am Ende der Pubertät

(RAAF 1974). Ähnliche Ergebnisse finden auch LEE et al (1976), die die Serumspiegel verschiedener Hormone bei Mädchen in der Pubertät bestimmt haben. Während also die mittleren Blutspiegel der wichtigsten Sexualhormone ansteigen, nimmt die durchschnittliche SHBG-Konzentration im Verlauf der Pubertät ab.

Die drei betrachteten Sexualhormone werden alle von SHBG gebunden, allerdings in unterschiedlichem Maße. Nach BURTON und WESTPHAL (1972) ist die Bindungsaffinität von DHT zu SHBG 240 - 300 % und von Östradiol 28 - 62 % im Vergleich zu Testosteron mit 100 %. Diese Tatsache bedeutet, daß die Wirksamkeit dieser drei Hormone in der Pubertät stärker zunimmt als es dem Anstieg ihrer Plasmakonzentration entspricht. Denn durch die Abnahme des SHBG steigt der Anteil des ungebundenen, wirksamen Hormons stärker an als die Absolutkonzentration des Hormons. Dies gilt vor allem für Testosteron und DHT.

Wie schon erwähnt, beeinflussen die Sexualhormone die SHBG-Konzentration. Dadurch ist erklärt, weshalb Mädchen in der Pubertät einen flacheren Abfall des Serum-SHBG zeigen als Jungen. Bei Jungen steigen Testosteron und DHT, von denen ein inhibitorischer Effekt auf die SHBG-Bildung ausgeht, in sehr viel stärkerem Maße an als bei Mädchen. Bei Mädchen dagegen steigen die Östrogene stärker an, die eine die SHBG-Konzentration erhöhende Wirkung haben. Alles in allem scheint jedoch die

Androgenwirkung auf das SHBG zu überwiegen oder es besteht ein anderer noch unbekannter Wirkungsmechanismus, der den Abfall des SHBG-Spiegels während der Pubertät bei beiden Geschlechtern bewirkt.

Bei erwachsenen Frauen bleibt die SHBG-Serumkonzentration während der Geschlechtsreife unverändert, jedenfalls ist keine Abhängigkeit vom chronologischen Alter festzustellen (siehe Abschnitt 5.2, Abb.4). Nach ANDERSON (1974) ist dies auch bei Männern bis zum 50. Lebensjahr der Fall. Die relativ starke Streuung der Meßwerte bei den erwachsenen Frauen (v = 62,7 %) könnte auf Schwankungen des SHBG-Spiegels von Tag zu Tag innerhalb des Menstruationszyklus beruhen. Bei der Bestimmung des SHBG im Serum an jedem Tag des Mensruationszyklus in zwei Fällen stellt ANDERSON (1974) zwar keine Gesetzmäßigkeit fest, jedoch variieren die Meßwerte im Einzelfall von Tag zu Tag erheblich: in einem Fall bewegen sie sich zwischen 6 und 10 x 10^{-8} Mol/l (SHBG-Serumkonzentration), im anderen zwischen 6 und 9 x 10^{-8} Mol/l.

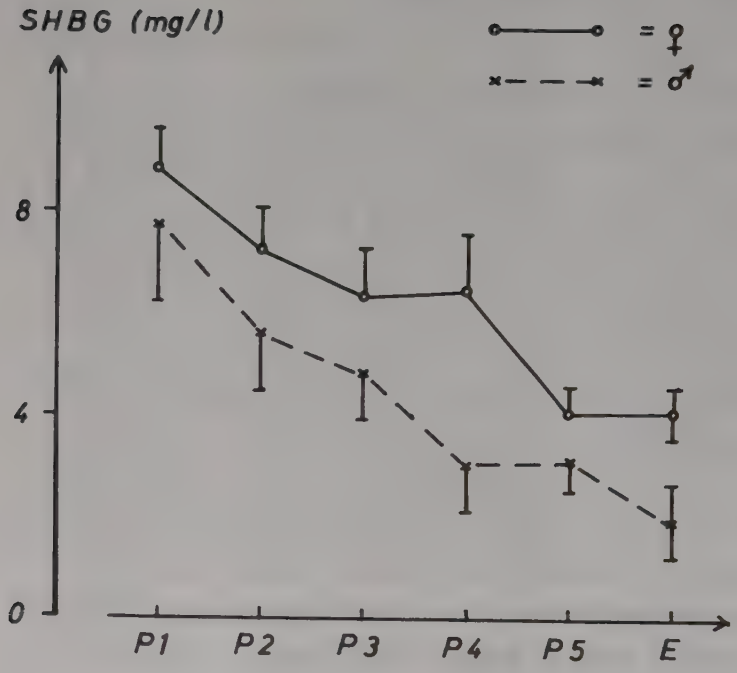

Abb.5 : Mittlere Serumkonzentration des SHBG ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) bei Jungen und Mädchen in den fünf Pubertätsstadien und bei Erwachsenen.

Ordinate: Konzentration in mg/l
Abszisse: Pubertätsstadien P 1 - P 5 und Erwachsenengruppe E

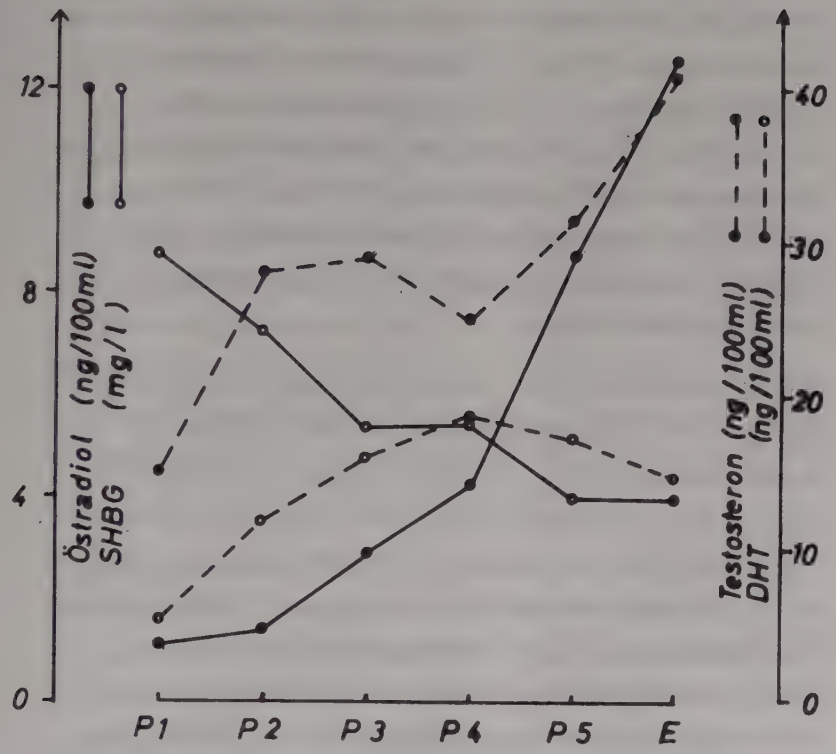

Abb.6 : Mittlere Plasmakonzentrationen von Östradiol, Testosteron und DHT (nach RAAF 1974) und mittlere Serumkonzentration des SHBG bei Mädchen in den fünf Pubertätsstadien und bei erwachsenen Frauen.

Ordinate: Konzentration in ng/100 ml bzw. mg/l
Abszisse: Pubertätsstadien P 1 – P 5 und Erwachsenengruppe E

6.3 SHBG BEI KINDERN MIT ENDOKRINOPATHIEN

Dieser Teil der Arbeit demonstriert die praktische Anwendbarkeit der Methode zur quantitativen Bestimmung des SHBG im Serum. In vielen Fällen liegt die SHBG-Konzentration deutlich höher bzw. niedriger als es dem Alter der Kinder entspricht, sodaß die Bedeutung des SHBG bei verschiedenen Erkrankungen beurteilt und zum Teil zur Erklärung von klinischen Beobachtungen herngezogen werden kann.

Bei der Untersuchung der Kinder mit Thyreosen wird erstmals ein TRF-Test simultan zur Bestimmung des SHBG im Serum durchgeführt. In den Fällen, in denen der TRF-Test eine Hypothyreose sichert, wird deutlich, daß bei Kindern mit Hypothyreose das Serum-SHBG niedriger liegt als bei gesunden Kindern (Tabelle 6: B.E.,G.F. und G.St.). Dies stimmt auch mit den Ergebnissen von OLIVO et al (1970) und TULCHINSKY und CHOPRA (1973) überein, die mit unterschiedlichen Methoden feststellen, daß hypothyreote Patienten erniedrigte SHBG-Serumspiegel haben, die unter Therapie wieder ansteigen. Dies bestätigt die vorliegende Untersuchung ebenfalls: sobald eine Substitution mit Schilddrüsenhormon durchgeführt wird, sind die SHBG-Serumkonzentrationen sogar überdurchschnittlich hoch (Tabelle 6: A.S.,M.W.,K.Sch. und T.G.). Dabei ist regelmäßig die TSH-Ausschüttung der Hypophyse bis an die Nachweisgrenze unterdrückt. Ob die überdurchschnittlichen

SHBG-Konzentrationen zustande kommen, weil bei der Substitutionsbehandlung bis an die Grenze zur Hyperthyreose gegangen wird, oder ob ein anderer Effekt mitspielt, kann hier nicht festgestellt werden. Jedenfalls ist die Erhöhung des SHBG-Spiegels bei weitem nicht so ausgeprägt wie bei einer Hyperthyreose, wo bis zu fünffach angestiegene Werte beobachtet werden (TULCHINSKY und CHOPRA 1973). In den Fällen, bei denen der TRF-Test im Normbereich liegt, sind die SHBG-Serumkonzentrationen auf altersentsprechender Höhe. Bei einigen liegen sie jedoch deutlich darunter (Tabelle 6: P.R. und A.B.). Dies kann darauf zurückzuführen sein, daß dort eine leichte sekundäre Hypothyreose vorliegt, die durch den TRF-Test nicht ausgeschlossen werden kann.

Im Folgenden werden nun die Ergebnisse aus Tabelle 7 diskutiert. Die unterschiedlichen SHBG-Konzentrationen bei den Mädchen mit Pubertas praecox im Pubertätsstadium P 3, die beide länger als ein Jahr mit Cyproteronacetat (Androcur ^{R}) behandelt werden, lassen sich durch die unterschiedlichen Testosteron-Plasmaspiegel erklären : Im Fall der B.W. ist dieser nicht erhöht, während er bei C.B. mit 37,5 ng/100 ml fast den Wert von erwachsenen Frauen (nach RAAF 1974) erreicht. Der inhibitorische Effekt des Testosteron auf das SHBG könnte bei C.B. den niedrigeren SHBG-Spiegel erklären. Auch bei M.M. ist die SHBG-Konzentration im Serum erniedrigt und die Konzentration der Plasmaandrogene leicht erhöht. Diese

Konstellation bewirkt ihrerseits eine starke Erhöhung des freien Testosteron (siehe "Einleitung"), was die Hypertrichose von M.M. trotz des nur leichten Anstiegs der Androgene verständlicher macht. Auf gleiche Weise lassen sich die Virilisierungserscheinungen beim adrenogenitalen Syndrom (D.D. und U.F.) erklären. Auch hier verstärkt das niedrige Serum-SHBG die Wirksamkeit des Testosteron. Hierzu passen die Ergebnisse von ROSENFIELD (1971), der bei einigen Frauen mit Hirsuitismus normale Testosteronspiegel findet, aber eine erniedrigte Testosteronbindungskapazität (TeBC).

Umgekehrt sind die Verhältnisse bei Gynäkomastie mit hohem SHBG-Spiegel (G.R.): Es wird vermehrt Testosteron (und DHT) gebunden und da Östrogen nicht so stark an SHBG gebunden wird, steigt der Gehalt an freiem Östrogen im Blut relativ zu Testosteron. Im anderen Fall von Gynäkomastie (A.L.) allerdings ist die SHBG-Konzentration nicht erhöht. Auch ANDERSON et al (1972b) finden bei Männern mit Gynäkomastie meistens keinen erhöhten SHBG-Spiegel, jedoch in einem Fall einen Anstieg auf das 2 - 3-fache des Normalwertes.

Bei Morbus Addison unter Therapie (M.B.) ist die SHBG-Konzentration nicht gegenüber Gesunden verändert, was zu erwarten ist; denn von Corticosteroiden ist keine Wirkung auf das SHBG bekannt. Extrem erhöht dagegen ist der SHBG-Spiegel in einem Fall von hypophysären Minderwuchs

mit Mangel an Wachstumshormon (STH) (Tabelle 7 : H.M.). Dies könnte auf den fortfallenden Einfluß des STH auf die SHBG-Aktivität zurückzuführen sein, d.h. die hemmende Wirkung des STH auf des SHBG ist entsprechend dem niedrigen STH-Spiegel zurückgegangen. Den umgekehrten Fall haben DE MOOR et al (1972) bei minderwüchsigen Kindern beobachtet, indem sie die SHBG-Aktivität vor und nach dreitägiger Behandlung mit STH bestimmt haben. Dabei stellen sie einen Abfall der SHBG-Aktivität auf 67 - 83 % des Ausgangswertes fest.

6.4 SHBG BEI MÄNNERN MIT PROSTATA-ERKRANKUNGEN

In einer kürzlich erschienenen Arbeit ist die SHBG-Bindungskapazität für DHT bei Männern mit Prostata-Karzinomen gemessen worden. Dort wird kein signifikanter Unterschied der SHBG-Bindungskapazität von Männern mit Prostata-Karzinomen zu der von gesunden Männern gleichen Alters gefunden (BARTSCH et al 1977), was mit den in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnissen übereinstimmt. CLARK et al (1971) haben die prozentuale Testosteron- und DHT-Bindung des Plasmas ebenfalls bei Männern mit Prostata-Karzinomen bestimmt und festgestellt, daß die Bindung unter Östrogen-Behandlung zunimmt. Dies bestätigt ein weiteres Mal, daß Östrogen einen positiven Effekt auf die spezifische Bindung der Sexualhormone hat.

Wie andere Forscher zuvor (VERMEULEN et al 1972, ANDERSON

1974) finden BARTSCH et al (1977) eine Erhöhung der SHBG-Kapazität bei Männern jenseits des 50. Lebensjahres: sie liegt bei Männern zwischen 20 und 40 Jahren signifikant niedriger als bei Männern zwischen 50 und 85 Jahren. PIRKE und DOERR (1975) kommen zum gleichen Ergebnis, indem sie feststellen, daß jenseits des 60. Lebensjahres freies DHT im Blut abfällt, obwohl das Total-DHT im Plasma auf gleicher Höhe bleibt. Alle diese Ergebnisse können auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Der Serum-SHBG-Spiegel von Männern über 50 Jahren bewegt sich zwischen 2,7 mg/l und 4,1 mg/l, während BLANK et al (in Druck) mit derselben Bestimmungsmethode bei jüngeren Männern eine durchschnittliche SHBG-Serumkonzentration von 1,9 mg/l finden.

Dieser Anstieg des SHBG im Serum bei Männern jenseits des 50. Lebensjahres bewirkt, daß die Abnahme des Gesamt-Testosteron im Plasma (siehe PIRKE und DOERR 1975) sich noch stärker ausprägt: es wird vermehrt Testosteron gebunden und das ungebundene, wirksame Testosteron im Plasma weiter reduziert.

7 Z U S A M M E N F A S S U N G

Seit der Isolierung des menschlichen Sexualhormon-bindenden Globulin (SHBG) durch MERCIER et al (1966) befassen sich zahlreiche Arbeiten mit der spezifischen Bindung von Sexualhormonen an Plasmaproteine und speziell mit dem SHBG. Dazu gehören Bestimmungen der SHBG-Aktivität bei einer Reihe von Krankheiten sowie bei gesunden Personen beiderlei Geschlechts in den verschiedenen Altersstufen. Während z.B. bei Jungen Übereinstimmung herrscht, daß die SHBG-Aktivität im Verlauf der Pubertät abfällt, liegen bei Mädchen einander widersprechende Ergebnisse vor (AUGUST et al 1969, GUPTA et al 1971 b, TULCHINSKY u. CHOPRA 1973). Um hier Klärung zu schaffen, wird in der vorliegenden Arbeit das Serum-SHBG bei Mädchen in der Pubertät unter Berücksichtigung der Pubertätsstadien nach TANNER (1962) bestimmt.

Da Untersuchungen zur Rolle des SHBG bei Kindern mit Endokrinopathien kaum vorliegen, wird außerdem bei einigen solchen Kindern SHBG im Serum bestimmt. Bei Kindern mit Thyreosen wird dabei gleichzeitig ein TRF-Test durchgeführt.

Zur Ergänzung schon erschienener Untersuchungen (z.B. BARTSCH et al 1977) schließlich werden Männer mit Prostata-Erkrankungen untersucht.

Die Ergebnisse der Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die angewandte Methode zur quantitativen Bestimmung des SHBG im Serum bietet den Vorteil der einfachen und schnellen Durchführbarkeit und ist ausreichend genau, um die SHBG-Serumkonzentration auch in Einzelfällen zu bestimmen und dort Aussagen zu erlauben.

2. Bei Mädchen fällt der SHBG-Serumspiegel im Verlauf der Pubertät auf etwa die Hälfte des vorpubertären Wertes ab und erreicht am Ende der Pubertät den durchschnittlich bei erwachsenen Frauen gemessenen Wert.

3. Erniedrigte SHBG-Konzentrationen treten auf bei Hypothyreose, adreno-genitalem Syndrom, Hypertrichose und in einem Fall von Pubertas praecox. Altersentsprechend ist das Serum-SHBG bei Morbus Addison und bei Gynäkomastie. Überdurchschnittlich hoch sind die SHBG-Konzentrationen bei Substitutionsbehandlung mit Schilddrüsenhormon, in einem anderen Fall von Gynäkomastie und bei hypophysärem Minderwuchs.

4. Männer mit Prostata-Karzinomen und Prostata-Hyperplasien zeigen bezüglich des SHBG im Serum keinen signifikanten Unterschied zu gesunden Männern gleichen Alters. Die durchschnittliche SHBG-Konzentration bei Männern über 50 Jahren jedoch liegt höher als die der jüngeren Männer.

8 LITERATURVERZEICHNIS

ALFSEN,A.: Etude de la liaison testosterone-serumalbumine et l'action de l'heptane sur la molecule de serum-albumine.
C.R.Lab.Carlsberg 33, 415 (1963)

ANDERSON,D.C.: Sex-hormone-binding-globulin
Clin.Endocr.(Oxf.) 3 , 69 - 96 (1974)

ANDERSON,D.C.,PEPPIAT,R.,SCHUSTER,L. and FISHER,R.: A new method for measurement of sex-hormone-binding-globulin in plasma and its clinical application. Proceedings of the Society for Endocrinology, 128th meeting.
J.Endocr. 55 , xi - xii (1972 a)

ANDERSON,D.C.,MARSHALL,J.C.,GALVAO-TELES,A. and CORKER, C.S.: Gynäcomastia and impotence associated with abnormal testosterone binding.
Proc.Roy.Soc.Med. 65 , 787 (1972 b)

ANDERSON,D.C.,LASLEY,B.L.,FISHER,R.A.,SHEPARD,J.H., NEWMAN,L. and HENDRICKX,A.G.: Transplacental gradients of sex-hormone-binding-globulin in human and simian pregnancy.
Clin.Endocr.(Oxf.) 5 , 657 - 669 (1976)

ATTANASIO,A.,BLANK,B.,RAGER,K. and GUPTA,D.: Sexual hormone binding globulin during male pubertal development in normal and pathological conditions. Communication to the European Society for Pediatric Endocrinology, 14th Annual Meeting, Berlin (1975)

ATTANASIO,A.,BLANK,B,SCHEEL,H.-G.,RAGER,K. and GUPTA,D.: SHBG concentration in girls during puberty.
(in Druck)

ATTANASIO,A.,MC CAFFERTY,E.,JENDRICKE,K.,RAGER,K.,GUPTA,D. and BIERICH,J.R.: The effect of gonadotropins on the "androgen status" in boys with undescended testes. Acta endocr.(Kbh.) Suppl. 173 , 167 (1973)

AUGUST,G.P.,TKACHUK,M. and GRUMBACH,M.M.: Plasma testosterone-binding affinity and testosterone in umbilical cord plasma, late pregnancy, prepubertal children and adults.
J.Clin.Endocr. 29 , 891 - 899 (1969)

BARTSCH,W.,HORST,H.-J.,BECKER,H. and NEHSE,G.: Sex hormone binding globulin binding capacity, testosterone, 5-alpha-Dihydrotestosterone, oestradiol and prolactin in plasma of patients with prostatic carcinoma under various types of hormonal treatment.
Acta endocr.(Kbh.) 85 , 650 - 664 (1977)

BLANK,B.: Isolierung und quantitative Bestimmung des menschlichen Sexualhormon-bindenden Globulin.
Diplomarbeit im Fachbereich Chemie der Universität Tübingen, Tübingen 1975

BLANK,B.,ATTANASIO,A.,RAGER,K. and GUPTA,D.: Determination of serum sex hormone binding globulin (SHBG) in pre-adolescent and adolescent boys.
J.Steroid Biochem. 9 , 121 - 125 (1978) (in Druck)

BURTON,M. and WESTPHAL,U.: Steroid hormone-binding proteins in blood plasma.
Metab. 21 , 253 - 276 (1972)

CLARK,A.F.,CALANDRA,R.S. and BIRD,C.E.: Binding of testosterone and 5-alpha-Dihydrotestosterone to plasma proteins in humans.
Clin.Biochem. 4 , 89 - 103 (1971)

CORVOL,P.L.,CHRAMBACH,A.,RODBORD,P. and BARDIN,C.W.: Physical properties and binding capacity of testosterone-estradiol binding globulin in human plasma, determined by polyacrylamide gel electrophoresis.
J.Biol.Chem. 246 , 3435 - 3443 (1971)

DE MOOR,P.: La physiopathologie de la beta-globuline plasmatique liant les 17-beta-hydroxysteroids. Ann.Endocr.(Paris) 31 , 429 - 436 (1970)

DE MOOR,P.,HEYNS,W. and BOUILLON,R.: Groth hormone and the steroid binding beta-globulin of human plasma. J.Steroid Biochem. 3 , 593 -600 (1972)

EIK-NES,K,SCHELLMAN,J.A.,LUMRY,R. and SAMUELS,L.T.: Binding of steroids to protein. First solubility determinations. J.Biol.Chem. 206 , 411 - 419 (1954)

FLEISCHER,N.,LORENTE,M.,KIRKLAND,J.,KIRKLAND,R., CLAYTON,G. and CALDERON,M.: Synthetic thyreotropin releasing factor as a test of pituitary thyreotropin reserve. J.Clin.Endocr. 34 , 617 - 624 (1972)

FUCHS,G.: Mathematik für Mediziner und Biologen. Berlin,Heidelberg,New York: Springer 1969

GALVAO-TELES,A.,ANDERSON,D.C.,BURKE,C.W.,MARSHALL,J.C., CORKER,C.S.,BOWN,R.L. and CLARK,M.L.: Biologically active androgens and oestradiol in men with chronic liver desease. Lancet 1 , 173 (1973)

GUPTA,D.: A longitudinal study of steroid excretion patterns in children during adolescent growth. Steroidologia 1 , 267 - 294 (1970)

GUPTA,D.: Inhärente Tendenz zur Weiblichkeit. Sexualmedizin 3 , 68 - 74 (1974)

GUPTA,D.: Changes in the gonadal and adrenal steroid patterns during puberty. Clin.Endocr.Metab. 4 , 27 - 55 (1975 a)

GUPTA,D. and MARSHALL,W.A.: A longitudinal study of the urinary excretion of individual steroids in children from 3 to 7 years old. Acta endocr.(Kbh.) 68 , 141 - 163 (1971 a)

GUPTA,D. and BUNDSCHU,H.D.: Testosterone and its binding in the plasma of male subjects with chronic renal failure.
Clin.chim.Acta 36 , 479 - 484 (1972 a)

GUPTA,D.,HUENGES,R. and RAGER,K.: Studies on testosterone-protein reactions in children in relation to their sexual maturation.
Acta endocr.(Kbh.) Suppl. 152 , 24 (1971 b)

GUPTA,D.,MC CAFFERTY,E. and RAGER,K.: Plasma-5-alpha-DHT in adolescent males at different stages of sexual maturation.
Steroids 19 , 411 - 431 (1972 b)

GUPTA,D.,ATTANASIO,A. and MC CAFFERTY,E.: Simultaneous radioimmunoassay of the androgens and oestrogens in the peripheral plasma of children during pubertal changes.
IV. Intern.Congr. of Endocr. Abstracts 54 (1972 c)

GUPTA,D.,ATTANASIO,A. and RAAF,S.: Plasma estrogen and androgen concentrations in children during adolescence.
J.Clin.Endocr. 40 , 636 - 643 (1975 b)

GUPTA,D.,RAGER,K.,ATTANASIO,A.,KLEMM,W. and EICHNER,M.: Sex steroid hormones during multiphase pubertal development.
J.Steroid Biochem. 6 , 859 - 868 (1975 c)

HANSSON,V.,LARSON,J. and REUSCH,E.: Physiochemical properties of the 5-alpha-dihydrotestosterone binding protein in human serum.
Steroids 20 , 555 - 574 (1972)

LEE,P.A.,XENAKIS,T.,WINTER,J. and MATSENBOUGH,S.: Puberty in girls: correlation of serum levels of gonadotropin, prolactin, androgens, estrogens and progestins with physical changes.
J.Clin.Endocr. 43 , 775 - 784 (1976)

MERCIER,C.,ALFSEN,A. and BAULIEU,E.E.: A testosterone binding globulin.
Proceedings of the Second Symposium on Steroid Hormones Exc.Med. I.C.S. 101 , 212 (1966)

MERCIER-BODARD,C.,ALFSEN,A. and BAULIEU,E.E.: Sex steroid binding plasma protein.
Acta endocr.(Kbh.) Suppl. 147 , 204 - 224 (1970)

MURPHY,B.E.P.: Binding of testosterone and estradiol in plasma.
Canad.J.Biochem. 46 , 299 - 302 (1968)

OLIVO,J.,SOUTHREN,A.L.,GORDON,G.C. and TOCHIMOTO,S.: Studies of the protein binding of testosterone in plasma in disorders of thyroid function: effect of therapy.
J.Clin.Endocr. 31,539 - 545 (1970)

PEARLMAN,W.H.: Measurement of testosterone binding sites
Acta endocr.(Kbh.) Suppl. 147 , 225 -235 (1970)

PEARLMAN,W.H. and CREPY,O.: Steroid protein interaction with particular reference to testosterone-binding globulin in human plasma.
J.Biol.Chem. 242 , 182 -189 (1967)

PIRKE,K.M. and DOERR,P.: Age-related changes in free plasma testosterone, dihydrotestosterone and oestradiol.
Acta endocr.(Kbh.) Suppl. 193 , 56 (1975)

RAAF,S.: Simultane radioimmunologische Bestimmung von Plasmaandrogenen und -östrogenen von Kindern in der Pubertät.
Dissertation im Fachbereich Klinische Medizin der Universität Tübingen, Tübingen 1974

RAGER,K. und GUPTA,D.: Isolierung des menschlichen sexualhormonbindenden Globulin (SHBG) mit der Polyacrylamidgelelektrophorese.
Endokrinologie 60 , 317 - 321 (1972)

RAGER,K.,GRÜNER,M.,VOELTER,W.,ATTANASIO,A. and GUPTA,D.: An easy method for the isolation and purification of Sex steroid binding protein (SSBP) from human plasma. Acta endocr.(Kbh.) Suppl. 173 , 64 (1973)

ROSENBAUM,W.,CHRISTY,N.P. and KELLY,W.G.: Electrophoretic evidence for the presence of an estrogen-binding-beta-globulin in human plasma. J.Clin.Endocr. 26 , 1399 - 1403 (1966)

ROSENFIELD,R.L.: Plasma testosterone binding globulin and indexes of the concentration of unbound plasma androgen in normal and hirsuite subjects. J.Clin.Endocr. 32 , 717 - 728 (1971)

ROSNER,W.: A simplified method for the quantitative determination of testosterone-estradiol-binding - globulin activity in human plasma. J.Clin.Endocr. 34 , 983 - 988 (1972)

ROSNER,W. and SMITH,W.: Isolation of testosterone-estradiol binding globulin. Meth.Enzymol. 36 , 109 - 120 (1975 a)

ROSNER,W. and SMITH,W.: Isolation and characterisation of testosterone-estradiol binding globulin in human plasma. Use of a novel affinity column. Biochemistry (Wash.) 14 , 4813 - 4820 (1975 b)

ROSNER,W.,CHRISTY,N.P. and KELLY,W.G.: Partial purification and preliminary charcterisation of estrogen-binding globulin from human plasma. Biochemistry (Wash.) 8 , 3100 - 3108 (1969)

ROSNER,W.,TOPPEL,S. and SMITH,R.N.: Testosterone-estradiol binding globulin of human plasma: Denaturation and protection. Biochim.Biophys.Acta 351 , 92 -98 (1974)

STUDER,H.: Schilddrüse in: Klinische Pathophysiologie, Hrsg.: SIEGENTHALER,W. Stuttgart: Thieme 1973

TANNER,J.M.: Wachstum und Reifung des Menschen.
Stuttgart: Thieme 1962

TULCHINSKY,D. and CHOPRA,I.J.: Competitive ligand-binding assay for measurement of Sex-hormone-binding globulin (SHBG).
J.Clin.Endocr. 37 , 873 - 881 (1973)

VAN BAELEN,H.,HEYNS,W.,SCHONNE,E. and DE MOOR,P.: An estradiol binding globulin in human serum: partial purification.
Ann.Endocr.(Paris) Suppl. 29 , 153 - 158 (1968)

VERMEULEN,A. and VERDONCK,L.: Studies on the binding of testosterone to human plasma.
Steroids 11 , 609 - 635 (1968)

VERMEULEN,A. and VERDONCK,L.: Influence of TeBG-binding of testosterone on its metabolic clearance rate.
Ann.Endocr.(Paris) 31 , 831 - 832 (1970)

VERMEULEN,A.,STOICA,T. and VERDONCK,L.: The apparent free testosterone concentration: an index of androgenity.
J.Clin.Endocr. 33 , 759 - 767 (1971)

VERMEULEN,A.,RUBENS,R. and VERDONCK,L.: Testosterone secretion and metabolism in male senescence.
J.Clin.Endocr. 34 , 730 - 735 (1972)

VERMEULEN,A.,VERDONCK,L.,VAN DER STRAETEN,M. and ORIE,N.: Capacity of the testosterone-binding-globulin in human plasma and influence of specific binding of testosterone to its metabolic clearance rate.
J.Clin.Endocr. 29 , 1470 - 1480 (1969)

WESTPHAL,U. and ASHLEY,B.D.: Steroid-protein interactions. VIII. Structure of delta-4-3-keto-steroids in relation to spectrophotometric interactions with human serum albumin.
J.Biol.Chem. 237 , 2763 - 2768 (1962)

LEBENSLAUF

Am 21. August 1950 wurde ich, Hans-Gerhard Scheel-Walter, als Sohn des Martin Scheel und der Barbara Scheel, geb. Hackbarth, in Stolzenau geboren.

Nach vier Grundschuljahren in Hamburg und in Tübingen trat ich 1961 in das Uhlandgymnasium in Tübingen ein. Dort legte ich am 13.6.1969 die Reifeprüfung ab. Von 1969 bis 1971 leistete ich meinen Zivildienst an den Mariaberger Heimen (Kreis Reutlingen) ab, bevor ich zum Sommersemester 1971 mit dem Medizinstudium an der Universität Tübingen begann. Am 21.12.1976 schloß ich das Medizinstudium mit dem Staatsexamen ab. Zwischen dem 1.10.1977 und dem 31.12.1978 war ich als Medizinalassistent an den Kreiskrankenhäusern Nagold, Reutlingen und Urach sowie an der Universitätskinderklinik Tübingen tätig.